Thèse de doctorat

De

L'UNIVERSITÉ D'ANGERS

Sous le sceau de

LA COMUE ANGERS – LE MANS

Par

Théophile THIBAULT

Dynamique mitochondriale et mitophagie : cibles thérapeutiques dans les cardiopathies liées à l'instabilité génomique mitochondriale au cours du vieillissement ?

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 17 décembre 2024

Unité de recherche : UMR CNRS 6015, INSERM U1083, Mitovasc, Equipe Mitolab

Rapporteurs avant soutenance :

Géraldine Farge, Maître de conférences, Université Clermont Auvergne
Déborah Tribouillard-Tanvier, Directrice de recherche, INSERM Bordeaux

Composition du Jury :

Président : Arnaud Chevrollier, Professeur, Université d'Angers
Examinateurs : Arnaud Mourier, Chargé de recherche CNRS, Bordeaux
Delphine Prunier-Mirebeau, Professeure d'Université et Praticienne Hospitalière, Angers

Dir. de thèse : Olivier Baris, Chargé de Recherche, CNRS, Angers

I. Avertissement

L'université n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les travaux des étudiant·es : ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

III. Remerciements

Je souhaiterais commencer par remercier toutes les mitochondries de France.

Je souhaite remercier Mesdames Farge et Tribouillard-Tanvier d'avoir accepté d'être rapportrices de mon manuscrit de thèse, ainsi que Madame Prunier-Mirebeau et Messieurs Chevrollier et Mourier, d'en être les examinateurs.

Bien sûr un grand merci à Guy Lenaers, directeur du laboratoire Mitovasc et de l'unité Mitolab, à Angers, pour m'avoir accueilli chaleureusement et mis en relation avec Olivier Baris, d'abord mon maître de stage puis de thèse, et maintenant un ami. Je remercie Olivier pour m'avoir proposé ce grand projet et m'avoir guidé, appris et corrigé malgré la situation sanitaire particulière, les nombreuses charges qui reposent sur ses épaules et les déconvenues sujettes à mon encadrement. Merci de votre gentillesse et votre honnêteté.

Merci beaucoup à Claudie pour son assistance hors-pair, la magicienne des Western-Blots, finalement je n'aurais pas mis le feu grâce à toi. Je n'aurais pas pu en arriver là sans ton aide précieuse !

Merci également à tous les membres des différents laboratoires de L'Institut de Biologie en Santé (IBS) m'ayant formé grâce à leur maîtrise technique, partagée avec pédagogie et bienveillance. Je pense à Isabelle et Catherine de MINT, m'ayant enseigné l'art expert de la cryo-coupe de tissu. Merci à Sophie Tamareille et Anne–Laure Guihot de Mitovasc pour m'avoir enseigné toutes les subtilités du Western Blot avec patience et sympathie. Rodolphe Perrot, Florence Manero, Quentin Massiquot, merci pour vos belles images de microscopie.

Merci Salim, Arnaud, Yannick, Cinzia et Morgane pour tous les coups de mains m'ayant fait avancer dans les manips et aux techniciennes de recherche multitâches de la mort : Aurélie, Anaïs et Mireille pour tout ce que vous avez apporté, à moi et au laboratoire tout entier.

De l'amour pour l'équipe descente de poubelle : une pensée à Jeanne pour avoir bravé sa peur et descendu les déchets chimiques avec moi et Pauline avec qui on turbo-tri, maitrise le Tetris de DASRI et bourre les bennes plus vite que nos ombres.

Nolwenn, je dois un verre pour m'avoir filler un milliard de conseils administratifs.

Une pensée pour Yann, sans qui je n'aurais pas pensé à remercier le CROUS pour les bons petits plats à 1 € m'ayant évité la disette et le jeûne.

Merci à tous mes étudiants, Louis j'espère que tu vas bien, on s'est bien marré et ton travail était clean, j'ai autant appris de toi que l'inverse. Melody merci beaucoup pour tout le travail que tu as abattu en si peu de temps. Paul, tu as charbonné avec précision et réflexion, tu m'as évité de passer des heures en culture cellulaire et pour ça je te remercie et te félicite, tu as beaucoup de potentiel, mets-le à bon escient 😉 !

Je remercie ma famille pour avoir écouté patiemment mes élucubrations scientifiques et révolutionnaires, le crew Tr49 de tous les bords de France, gros support les potes,
Ouh ouh ouh !!!

Merci Laura, un petit ragondin qui fait beaucoup de bien <3.

Spéciale dédicace aux alchimistes.

After chez Paulo !!!

IV. Abréviations

AA	Acide Aminé
ADN	Acide DésoxyRiboNucléique
ADNmt	ADN mitochondrial
AG	Acide Gras
AOD	Atrophie Optique Dominante
AMP(c)(K)	Adénosine MonoPhosphate (cyclique) (Kinase)
ARN(m)(r)(t)	Acide RiboNucléique (messager) (ribosomal) (de transfert)
ANT	Adénine Nucléotide Translocase
Atg	Autophagy-related protein
ATP	Adénosine TriPhosphate
AV	AtrioVentriculaire
BAV	Bloc Atrio-Ventriculaire
BET	Bromure d'EThidium
BER	Base Excision Repair
cds	Coding SequenCes
CGR	Cellules Ganglionnaires de la Rétine
COX	Cytochrome-c Oxydase ou complexe IV (CIV)
COX^-	Cytochrome-c Oxydase-déficient.e (ou négative)
CKM	Créatine Kinase Musculaire
CL	CardioLipine
CM	CardioMyocyte
CQ	Contrôle-Qualité
CR	Chaîne Respiratoire
CVP	Contraction Ventriculaire Prématurée
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	DiméthylSulfOxyde
DR	Direct Reapeat
DSB(R)	Double Strand Break (Repair)
DTT	DiThioThréitol
ECG	ElectrocardioGramme
FACS	Fluorescence-Activated Cell Sorting
FRET	Fluorescence Resonance Energy Transfer
GAPDH	GlycérAldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase
(e)GFP	(emerald) Green Fluorescent Protein
HRP	Horse Radish Peroxidase
IMM	Membrane Mitochondriale Interne
IMS	eSpace InterMembranaire
IF	ImmunoFluorescence
IP	Intra-Péritonéal.e
IRES	Internal Ribosome Entry Site
KO	Knock-Out
KSS	Syndrome de Kearns-Sayre
LHON	Neuropathie Optique Héréditaire de Leber
M1	fusion promoter M1
MCV	Maladies CardioVasculaires
MDDS	Syndrome de Déplétion de l'ADN Mitochondrial
MET	Microscopie Electronique à Transmission
MERRF	Epilepsie Myoclonique à Ragged Red Fibers
MFN	MitoFusiNe
MMR	MisMatch Repair
MS	Muscles Squelettiques

MTS	Mitochondrial Targeting Sequence
NGS	Next Generation Sequencing
OMM	Membrane Mitochondriale Externe
OMS	Organisation Mondiale de la Santé (WHO en Anglais)
OXPHOS	PHOSphorylation Oxydative
PBS	Phosphate Buffer Saline
PC	PhosphatidylCholine
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne
PE	PhosphatidylEthanolamine
PEG	PolyEthylène Glycol
(c)(ad)PEO	Ophtalmoplégie Progressive Externe (chronique) (autosomale dominante)
PFA	ParaFormAldéhyde
PI	PhosphatidylInositol
RE	Réticulum Endoplasmique
ROS	Reactive Oxygene Species
SA	Sino-Atrial
SANDO	Sensory Ataxic Neuropathy with Dysarthria and Ophthalmoparesis
SASP	Senescence Associated Secretory Phenotype
SDH	Succinate DésHydrogénase
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TBST	Tris-Buffered Saline, Tween® 20
TIM	Translocase of the Inner Membrane
TM(D)	(Domaine) TransMembranaire
TMRM	ester méthylique de TétraMéthylRhodaMine
TOM	Translocase of the Outer Membrane
UA	Urolithine A
UV	Ultra-Violet
WB	Western Blot
WT	Wild-Type

I. Sommaire

I. Avertissement 1

II. Engagement de non-plagiat 2

III. Remerciements 4

IV. Abreviations 6

I. Sommaire 9

1. Introduction 11

1.1. Préambule 11

1.2. Les mitochondries 12

1.3. L'ADN mitochondrial 25

1.4. Pathologies mitochondriales 31

1.5. Twinkle 42

1.6. Les contrôles-qualité de l'ADN mitochondrial 47

1.6. Le vieillissement 79

1.7. Le cœur 88

1.8. Implication des mitochondries dans le vieillissement pathologique cardiaque 93

1.9. Objectifs du doctorat 112

2. Materiel & Methodes 119

2.1. Modèles murins 119

2.2. Traitements pharmacologiques des souris 124

2.3. Traitement du tissu cardiaque 125

2.4. ADN 126

2.5. Protéines 133

2.6. Histochimie 137

2.7. Imagerie 138

2.8. Télémétrie 143

2.9. Statistiques & réalisations graphiques 144

3. Resultats 146

3.1. La fusion mitochondriale médiée par OPA1 protège les muscles cardiaque et squelettique de la COX-déficience mais pas de l'accumulation de délétions de l'ADNmt chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} 146

3.2. Stimulation de la fusion mitochondriale par IP journalière de M1 fusion promoter 157

3.3. L'autophagie est plus forte dans le cœur des souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois mais s'agit-il de mitophagie ? 164

3.4. Le traitement à l'Urolithine A (UA) 168

4. Conclusion-discussion 174

4.1. Remise en contexte *174*
4.2. La fusion mitochondriale à un rôle protecteur lors du vieillissement cardiaque et musculaire . *175*
4.3. La stimulation de la fusion mitochondriale par le M1 fusion promoter n'a pas amélioré le phénotype cardiaque des souris K320E-Twinkle^{Myo} à la dose testée..... *176*
4.4. La souris K320E-TwinkleMyo présente une mitophagie exacerbée *177*
4.5. La stimulation de la mitophagie par l'UA n'est pas suffisante pour améliorer le phénotype cardiaque des souris K320E-Twinkle^{Myo} à la dose testée *177*
5. PERSPECTIVES 178
5.1. Limitations de l'étude *178*
5.2. Modèle K320E-Twinkle^{Myo}-Opa1^{delTTAG} *179*
5.3. Traitement au M1..... *179*
5.4. Mitophagie chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}..... *180*
5.5. Traitement UA *181*
5.6. Sénescence *181*
6. PROJET ANNEXE : Y506C, NOUVEAU VARIANT DE *TWNK* IMPLIQUE DANS L'ATROPHIE OPTIQUE DOMINANTE (AOD) ?..... 182
6.1 Introduction *182*
6.2. Matériel et Méthode..... *191*
6.3. Résultats Préliminaires..... *200*
6.4. Discussion..... *207*
6.5. Conclusions-Perspectives *209*
7. ANNEXES 209
7.1. Colorations COX/SDH dans les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo}, Drp1$^{+/-}$, Opa1^{delTTAG} et doubles mutants de 18 mois..... *209*
7.2. Observation de regroupement de mitochondries sous-sarcolemmales chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois..... *211*
7.3. Observation de fibres musculaires atrophiées, présentant une déficience mitochondriale et en voie de régénération chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois..... *213*
BIBLIOGRAPHIE..... 215
TABLE DES MATIERES 246
TABLE DES FIGURES..... 251
TABLE DES TABLEAUX..... 256

1.Introduction

1.1. Préambule

Le vieillissement de la population est une tendance démographique déterminante du XXIe siècle, qui présente de profonds défis et opportunités pour la santé mondiale. Parmi la myriade de maladies liées à l'âge, les maladies cardiovasculaires (MCV) restent la principale cause de morbidité et de mortalité dans le monde, soulignant le besoin urgent de comprendre les processus biologiques à l'origine du vieillissement cardiaque. Au cœur de ce processus se trouve le dysfonctionnement mitochondrial, une caractéristique du vieillissement qui joue un rôle essentiel dans le déclin de la fonction cardiaque. Cette thèse explore les mécanismes par lesquels le dysfonctionnement mitochondrial contribue au vieillissement cardiaque, offrant des perspectives sur les stratégies thérapeutiques potentielles visant à atténuer le déclin cardiaque associé à l'âge. Ce travail s'inscrit dans l'objectif plus large de promouvoir une réduction des charges de soins de santé et la compréhension des facteurs induisant un vieillissement en bonne santé afin de permettre aux individus de maintenir leur qualité de vie jusqu'à un âge avancé.

1.2. Les mitochondries

1.2.1. Définition, origine, importance

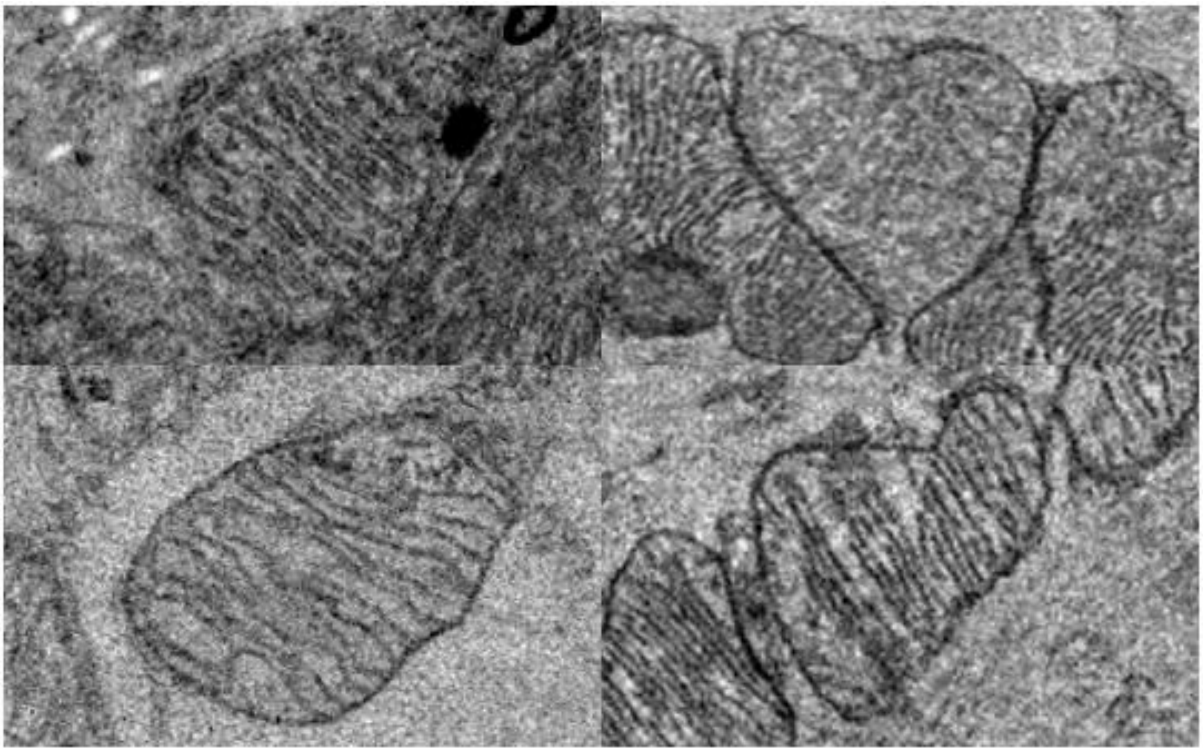


Figure 1 : Image de mitochondries cardiaques observées au microscope électronique à transmission

Image obtenue au JEOL™, modèle JEM-1400, utilisé à 120kV. L'imagerie au Microscope Electronique à Transmission (MET) offre un contraste important entre les membranes mitochondriales, le soma et le cytosol, ce qui permet d'observer clairement ces invaginations de la membrane interne, les crêtes mitochondriales.

L'étymologie de « mitochondrie » vient des mots Grecs : *mitos* (filamenteux) et *chondros* (granulaire). Ce nom est donné pour la première fois par Carl Benda pour leur structure caractéristique, en 1898.[1] Les mitochondries (**Figure 1**) sont des organites présents dans le cytoplasme de toutes les cellules eucaryotes à l'exception des érythrocytes matures, et dont la transmission héréditaire est maternelle. Les ovocytes contiennent plus de mitochondries que toute autre cellule, quelle que soit l'espèce, et celles-ci vont constituer l'entièreté de la population mitochondriale de l'embryon après fécondation. Les quelques mitochondries provenant des spermatozoïdes sont activement éliminées lors de l'embryogenèse par des mécanismes qui impliqueraient l'autophagie.[2] Ces organites sont souvent présentés comme la centrale énergétique de la cellule du fait de : leur rôle clé dans la production d'énergie, la phosphorylation oxydative, le cycle de Krebs ou encore la

β-oxydation des acides gras. Ils sont, au total, responsable d'environ 90 % de la production énergétique des cellules eucaryotes.[3] Historiquement, la théorie endosymbiotique formulée par Lynn Margulis en 1967[4] propose que ces organites très similaires, génétiquement ou au niveau de le composition lipidique de leurs membranes, à la famille des Rickettsies ou aux α-protéobactéries[5], soient de supposés vestiges de l'endocytose ancestrale d'une bactérie par une cellule procaryote ou proto-eucaryote.

Les mitochondries sont à l'interface de nombreux métabolismes qui permettent la survie, la croissance, la prolifération et la fonction des cellules.[6] Ainsi l'investigation des altérations pouvant être subies par les mitochondries est indispensable pour comprendre leur implication dans les pathologies. Cela est d'autant plus vrai pour les maladies cardiovasculaires (MCV), première cause de mortalité dans le monde[7], qui affectent un organe dont la demande énergétique considérable est, de fait, dépendante de la qualité de ses mitochondries. Le facteur de risque majeur pour les MCV étant le vieillissement et les mitochondries accumulant des dommages au cours de ce processus, leur défaillance pourrait y jouer un rôle majeur, induisant donc la perte des fonctions cardiaques[8,9] mais affectant également la mobilité ou la vision, les pathologies musculaires[10] et oculaires[11] étant aussi étroitement liées au vieillissement mitochondrial.[12]

1.2.2. Structure

Les mitochondries mesurent entre 0.5 et 1 µm de diamètre et peuvent atteindre plus de 20 µm de longueur car elles sont organisées sous la forme d'un réseau dynamique et peuvent fusionner et fissionner entre elles. En effet, ces organites se présentent sous différentes morphologies, en termes de rondeur et de taille, ou de leur ultrastructure définie essentiellement par le repliement des membranes mitochondriales.

La mitochondrie est composée de la membrane mitochondriale interne (IMM), séparant le la matrice de l'espace intermembranaire (IMS), et la membrane externe (OMM), séparant l'IMS du cytosol (**Figure 1**). Toutes deux sont composées d'une bicouche phospholipidique, constituées principalement de phosphatidylcholine (PC), phosphatidyléthanolamine (PE), cardiolipine (CL), et phosphatidylinositol (PI), majoritairement synthétisés par le réticulum endoplasmique. De la phosphatidylsérine et de l'acide phosphatidique sont également présents mais ne représente que 5 % à eux deux.

S'il est difficile d'affirmer que la répartition des lipides membranaires de la mitochondrie est tissus-dépendante[13], celle-ci varie légèrement entre mammifères[14] et est hélas peu documentée sur humain ou souris. La composition lipidique diffère également entre l'IMM

et l'OMM (**Tableau 1**), comme cela a bien été défini dans le foie de rat[13] et le porc, un modèle plus proche de l'homme.[15]

Tableau 1 : Composition lipidique des membranes mitochondriales interne et externe chez le rat et le porc

	Rat		Porc	
Composant	**IMM (%)**	**OMM (%)**	**IMM (%)**	**OMM (%)**
CL	14-23	0-1	25.4	0.4
PC	38-45	44-59	26.5	56.3
PE	32-39	20-35	37.9	28
PI	3-7	5-20	3.4	9.3

L'IMM est également très riche en protéines (80 %)[16], qui avec la cardiolipine, présente en quantité supérieure à l'OMM, permettent son repliement et sa compartimentation, donnant une structure à la mitochondrie tout en régulant de manière efficace les échanges entre l'IMS et la matrice. Ses repliements induisent aussi les invaginations très caractéristiques de l'IMM que l'on nomme « crêtes mitochondriales ».

Au sein de ces crêtes sont insérés les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire, assurant la chaîne des oxydations, lesquelles sont couplées à la phosphorylation de l'ADP + phosphate inorganique (Pi) en ATP au niveau de l'ATP synthase. Cette composition riche lui confèrent une moindre perméabilité que la membrane externe, elle a donc besoin de transporteurs spécifiques tels que le transporteur du phosphate inorganique, TIM (Translocase of the Inner Membrane) permettant le passage des protéines dans la matrice ou encore l'adénine nucléotide translocase (ANT) permettant l'échange d'ADP et d'ATP.[17]

L'OMM est plus riche en lipides (50 %), relativement lisse, perméable et très fluide, permettant les interactions entre le cytoplasme et l'IMS grâce à différentes familles de protéines « β-barrel », des transporteurs ioniques et peptidiques comme les porines, « Voltage-Dependant-Anion-Channel » (VDAC) pour le transport des molécules inférieures à 4-5 kDa[18] et TOM (Translocase of the Outer Membrane) pour le transport des molécules supérieures à 10 kDa.[19] Ces transporteurs sont essentiels puisque la majorité des protéines mitochondriales est synthétisée hors de la mitochondrie. Différents signaux d'adressages tels que les MTS (Mitochondrial Targeting Sequence) sont nécessaires à l'import de ces protéines.[20]

La matrice est, elle, très active métaboliquement puisqu'elle est le siège de nombreuses voies métaboliques telles que la β-oxydation des acides gras, le cycle de Krebs, la biosynthèse de l'hème et des centres fer-soufre ainsi que la synthèse des nucléotides. Selon les tissus, la matrice contient également un ensemble d'enzymes impliqué dans le cycle de l'urée, la néoglucogénèse, ou encore la synthèse d'hormones stéroïdes. Au niveau matriciel sont localisés les nucléoïdes, composés d'ADN mitochondrial associé à des protéines impliquées dans sa réplication et son expression. Les mitochondries disposent en effet d'un génome mitochondrial dont la transmission est maternelle, constitué d'un ADN double brin circulaire de 16 569 paires de bases chez l'Homme.[21]

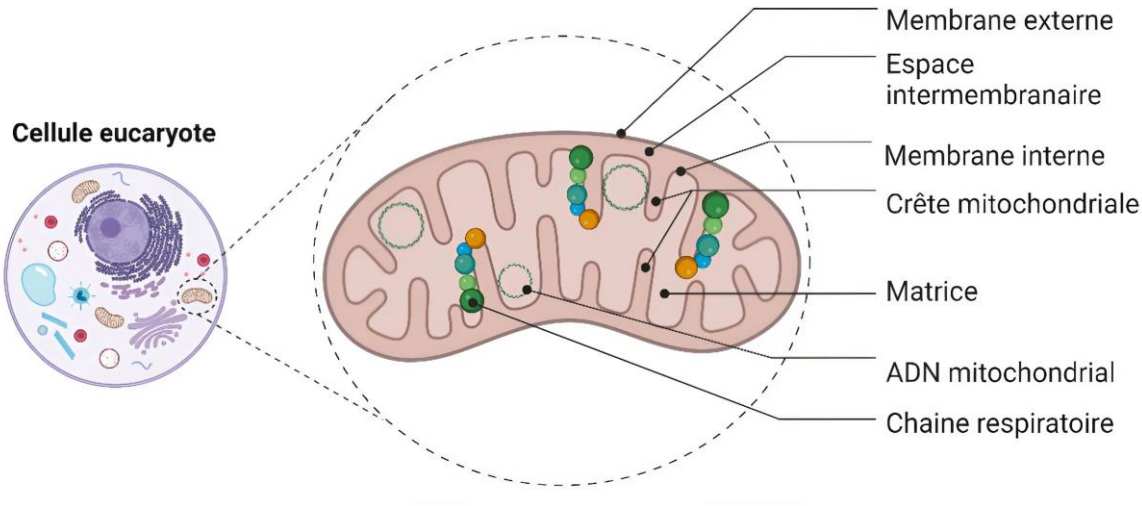


Figure 2 : Schéma structurel d'une mitochondrie

1.2.3. Répartition

Selon le type cellulaire et les besoins énergétiques de la cellule, le nombre de mitochondries varie de quelques centaines à quelques milliers. Elles constituent par exemple 20 % du volume cytosolique dans les cellules hépatiques contre 40 % dans les cellules cardiaques. Les mitochondries ne sont pas statiques, elles se déplacent activement au sein de la cellule grâce à l'interaction avec les microtubules du cytosquelette et des moteurs moléculaires comme la kinésine, qui dirige le transport des mitochondries vers la périphérie de la cellule, et la dynéine, qui le dirige vers le centre.[22] Cette répartition est cruciale pour répondre aux besoins énergétiques changeants de la cellule et pour maintenir une distribution homogène des mitochondries. Un transport mitochondrial dysfonctionnel peut être associé avec différentes pathologies

neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer[22], la maladie de Charcot Marie-Tooth (CMT)[23] ou encore la sclérose latérale amyotrophique.[24]

1.2.4. Biogenèse

La biogenèse mitochondriale est régulée par la voie PGC-1α-NRF-1/2-TFAM. PGC-1α augmente le nombre de mitochondries ainsi que de copies d'ADNmt et induit l'expression des sous-unités OxPhos, qui stimulent la respiration mitochondriale.[25] PGC-1α active également NRF-1 et NRF-2 qui peuvent se lier au promoteur de TFAM pour induire son expression et donc stimuler la réplication et la transcription de l'ADNmt.

Plusieurs cascades de signalisation régulent la voie PGC-1α-NRF-1/2-TFAM (**Figure 3**). Parmi celles-ci, le rapport AMP/ATP et les niveaux de Ca^{2+} sont particulièrement importants. Des niveaux accrus d'AMP activent l'adénosine monophosphate protéine kinase (AMPK), qui phosphoryle directement PGC-1α. Le PGC-1α phosphorylé est alors capable de réguler sa propre expression génique, ainsi que celle de plusieurs gènes mitochondriaux.[26] Il a également été observé que l'AMPK induit la biogenèse mitochondriale via NRF-1, impliquant probablement l'activation de PGC-1α.[27] Récemment, il a été rapporté que l'AMPK phosphorylait des facteurs épigénétiques, conduisant à une expression accrue de PGC-1α et de TFAM.[28] L'AMP peut également être convertie en AMP cyclique (AMPc) par l'adényl cyclase (AC). L'AMPc déclenche de nombreuses voies cellulaires, notamment par l'intermédiaire de la kinase dépendante de l'AMPc (PKA). Dans le noyau, la PKA phosphoryle la protéine de liaison à l'élément de réponse à l'AMPc (CREB)[29], un facteur de transcription qui se lie au promoteur PGC-1α.[30] L'activation de l'AC par la forskoline augmente les taux d'AMPc, ce qui finalement entraîne l'élévation de PGC-1α. Cette casacade est abrogée lorsqu'une forme dominante négative de CREB est exprimée.[31] La voie AMPc-PKA-CREB module PGC-1α, conduisant à l'activation de NRF-1/2 et de TFAM, favorisant ainsi la biogenèse mitochondriale (**Figure 3**).

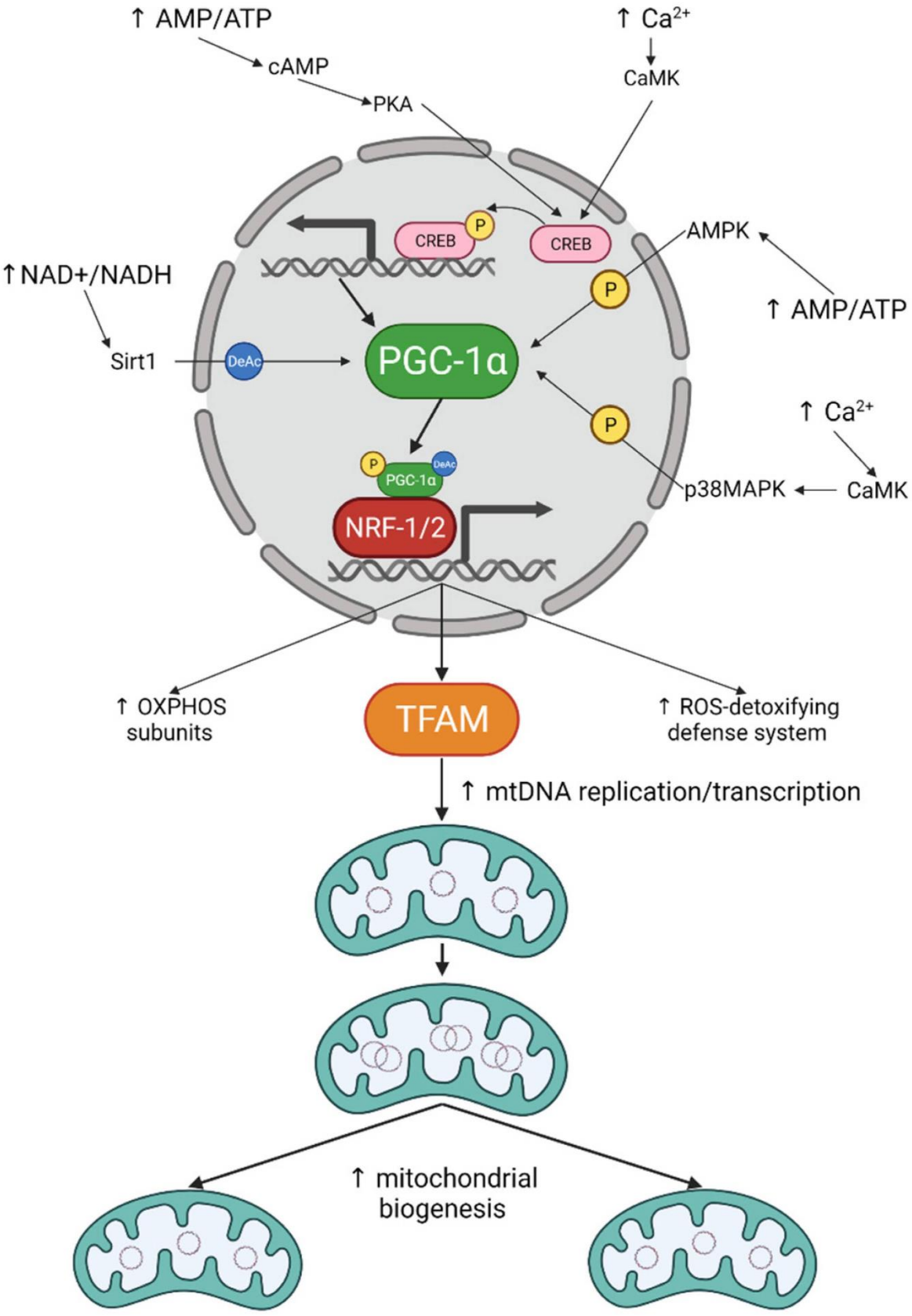


Figure 3 : Cascades de signalisation de la biogenèse mitochondriale

De F.R. Jornayvaz & G.I. Shulman, 2014

1.2.5. Fonction

1.2.5.1. Glycolyse

La glycolyse est une voie métabolique centrale qui, même si elle n'a pas lieu dans la mitochondrie, joue un rôle crucial dans la production d'énergie cellulaire en décomposant le glucose en pyruvate qui va ensuite être utilisé par la mitochondrie pour produire de nombreuses molécules d'ATP, la molécule organique énergétique permettant la plupart des mouvements biologiques au niveau cellulaire. Ce processus se produit dans le cytoplasme des cellules procaryotes et eucaryotes et est anaérobie. La glycolyse implique une série de dix réactions catalysées par des enzymes qui convertissent une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate, générant un gain net de deux molécules d'ATP et de deux molécules de NADH (**Figure 44**). La glycolyse fournit non seulement une source rapide d'énergie aux cellules, mais génère également des intermédiaires qui peuvent être utilisés dans d'autres voies métaboliques, telles que le cycle de l'acide citrique et la fermentation. Sa régulation est étroitement contrôlée par des enzymes clés, garantissant que les besoins énergétiques cellulaires sont satisfaits efficacement dans des conditions physiologiques variables.

L'équation finale est :

1 glucose + 2 ADP + 2 Pi + 2 NAD^+ → 2 pyruvate + **2 ATP** + 2 ($NADH + H^+$) + 2 H_2O

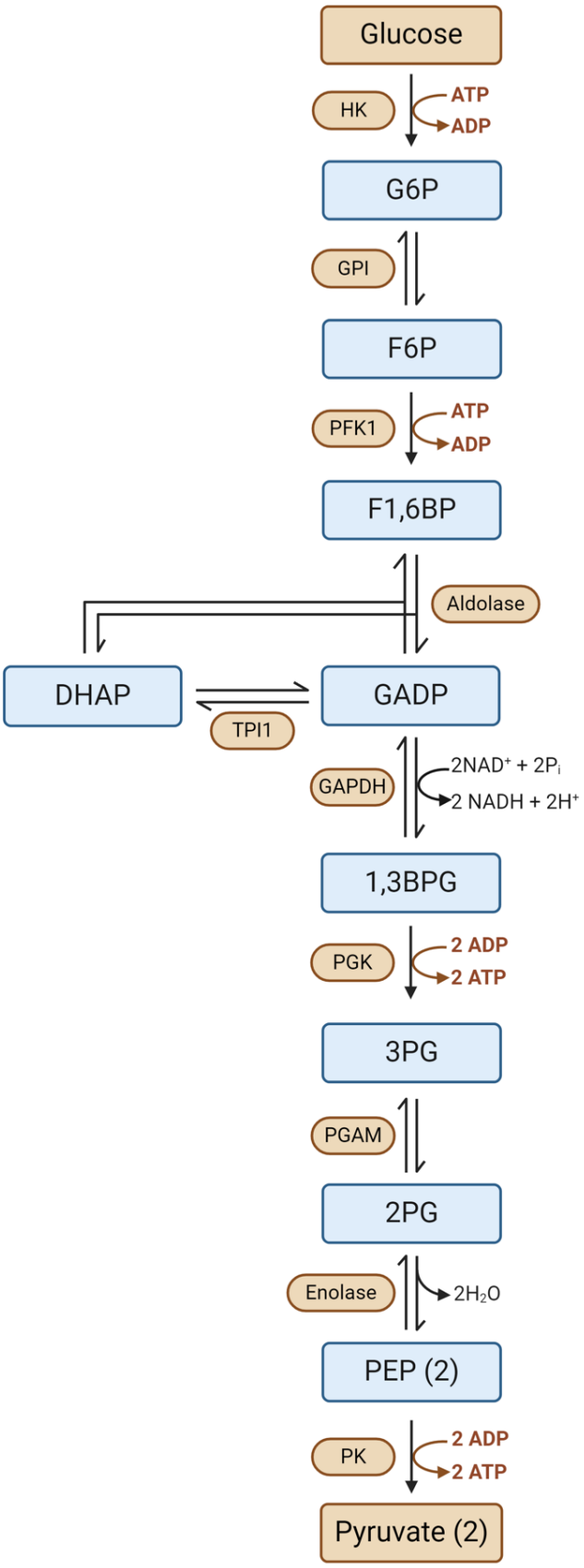


Figure 4 : Schématisation de la glycolyse

1.2.5.2. β-Oxydation des acides gras

La β-oxydation des acides gras (AG) est une voie catabolique cruciale qui décompose les acides gras pour générer de l'ATP, en particulier lorsque le glucose est rare. Le processus se produit dans les mitochondries et comprend plusieurs étapes, commençant par la transformation des acides gras dans le cytosol en acyl-CoA gras par l'enzyme acyl-CoA synthétase ATP-dépendante puis l'acyltransférase I les conjugue à la carnitine.

Cette transformation permet l'import des AG dans la matrice mitochondriale via la navette carnitine, ensuite l'enzyme carnitine acyltransférase II les reconvertit en acyl-CoA gras pour la β-oxydation qui se déroule en quatre étapes récurrentes : oxydation, hydratation, une deuxième oxydation et thiolyse. Chaque cycle raccourcit l'acide gras de deux unités de carbone, générant de l'acétyl-CoA, du NADH et du $FADH_2$.

Déshydrogénation : l'acyl-CoA déshydrogénase élimine deux hydrogènes, formant une double-liaison trans entre les carbones α et β et générant du $FADH_2$.

Hydratation : l'énoyl-CoA hydratase ajoute de l'eau à travers la double liaison, la transformant en groupe hydroxyle.

Oxydation : le groupe hydroxyle est oxydé en groupe céto par la β-hydroxyacyl-CoA déshydrogénase, produisant du NADH.

Thiolyse : Enfin, la thiolase clive le β-cétoacyl-CoA, libérant un acétyl-CoA et un acyl-CoA raccourci, qui réintègre le cycle.

Chaque cycle de β-oxydation génère une molécule d'acétyl-CoA, qui entre dans le cycle de l'acide citrique pour une oxydation supplémentaire, produisant de l'ATP, du NADH et du $FADH_2$. À chaque cycle, la β-oxydation fournit une énergie importante par phosphorylation oxydative. La voie est étroitement régulée par la disponibilité des acides gras, ainsi que par des enzymes clés, en particulier la carnitine acyltransférase I, qui est inhibée par le malonyl-CoA pour empêcher la synthèse et la dégradation simultanées des acides gras.[32]

L'équation finale est :

C_n-acyl-CoA + FAD + NAD^+ + H_2O + CoA → C_{n-2}-acyl-CoA + $FADH_2$ + NADH + H^+ + **acetyl-CoA**

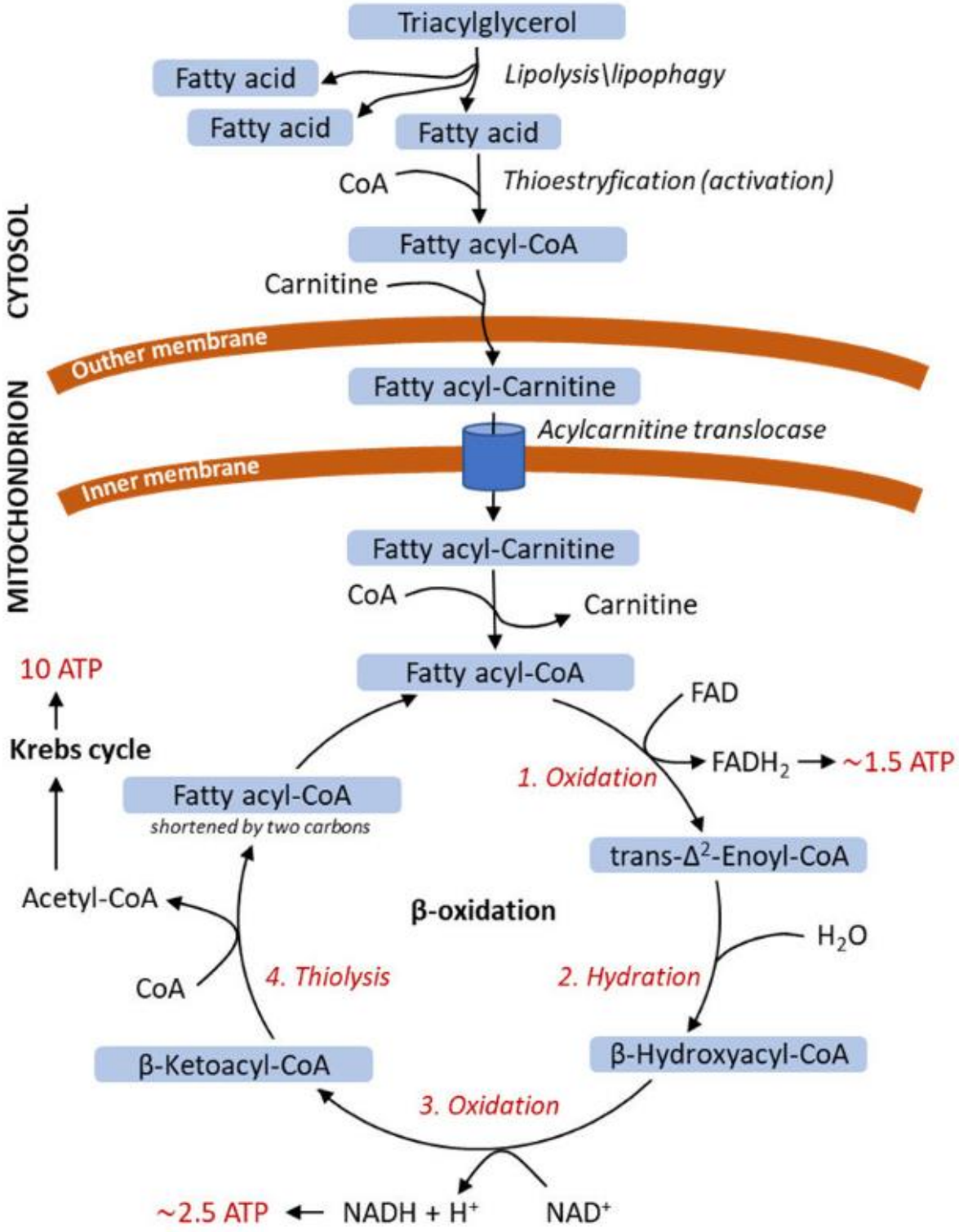


Figure 5 : Schématisation de la β-oxydation des acides gras

A. Kloska *et al.*, 2020

1.2.5.3. Cycle de Krebs

Le cycle de Krebs (Martínez-Reyes et Chandel, 2020) est une voie métabolique prenant place dans la matrice mitochondriale, essentielle à la réduction du NAD^+ et du FAD^+ en NADH et $FADH_2$, elle est ainsi couplée à la phosphorylation oxydative (OXPHOS) mise en place par les complexes protéiques de la chaîne respiratoire (CR) située sur les crêtes mitochondriales. Le cycle de Krebs commence par la condensation de l'acétyl-CoA, dérivé du pyruvate, avec l'oxaloacétate pour former du citrate par l'intermédiaire de la citrate synthase. Neuf réactions biochimiques suivent, produisant du GTP, 3 molécules de NADH et 1 $FADH_2$ (**Figure 6**). Un NADH supplémentaire est généré par la pyruvate-déshydrogénase. Les cofacteurs réduits sont ensuite oxydés dans la chaîne respiratoire pour synthétiser l'ATP.

L'équation finale est :

$CH_3\text{-}CO\text{-}COOH + 4\ NAD^+ + FAD + ADP + Pi + 2\ H_2O \rightarrow 3\ CO_2 + 4\ NADH + 4\ H^+ + FADH_2$ + **2 ATP**

1.2.5.4. Phosphorylation Oxydative

Le rôle principal des mitochondries est de produire de l'adénosine triphosphate (ATP) à partir de l'adénosine diphosphate (ADP) et du phosphate inorganique (Pi). Ce processus implique une série de réactions d'oxydo-réduction orchestrées par les 4 complexes protéique de la chaîne de transfert d'électrons, située dans l'IMM couplées à la phosphorylation de l'ADP et du Pi par l'ATP synthase, parfois nommé le complexe V. L'ensemble de ces éléments se nomme la chaîne respiratoire (CR) et le processus par lequel celle-ci synthétise l'ATP est connu sous le nom de phosphorylation oxydative (OXPHOS) (**Figure 7**).

La chaîne de transport d'électrons (ETC) se compose de quatre complexes, chacun constitué de plusieurs sous-unités, intégrés dans la membrane mitochondriale interne. Ces complexes sont fonctionnellement et physiquement interconnectés : Complexe I (CI, NADH-ubiquinone réductase), Complexe II (CII, succinate-ubiquinone réductase), Complexe III (CIII, ubiquinol-cytochrome c réductase) et Complexe IV (CIV, cytochrome c oxydase). L'ETC transfère le potentiel énergétique des électrons dérivés de $NADH/NAD^+$ et $FADH_2$/FAD, principalement fournis aux complexes de la chaîne respiratoire par le cycle de Krebs et la β-oxydation des acides gras, en une force motrice protonique (Δp). La FAD dispose d'électrons d'un niveau d'énergie inférieur à ceux du NADH, ainsi, elle est moins efficace pour les transférer et donc liée uniquement au CII.

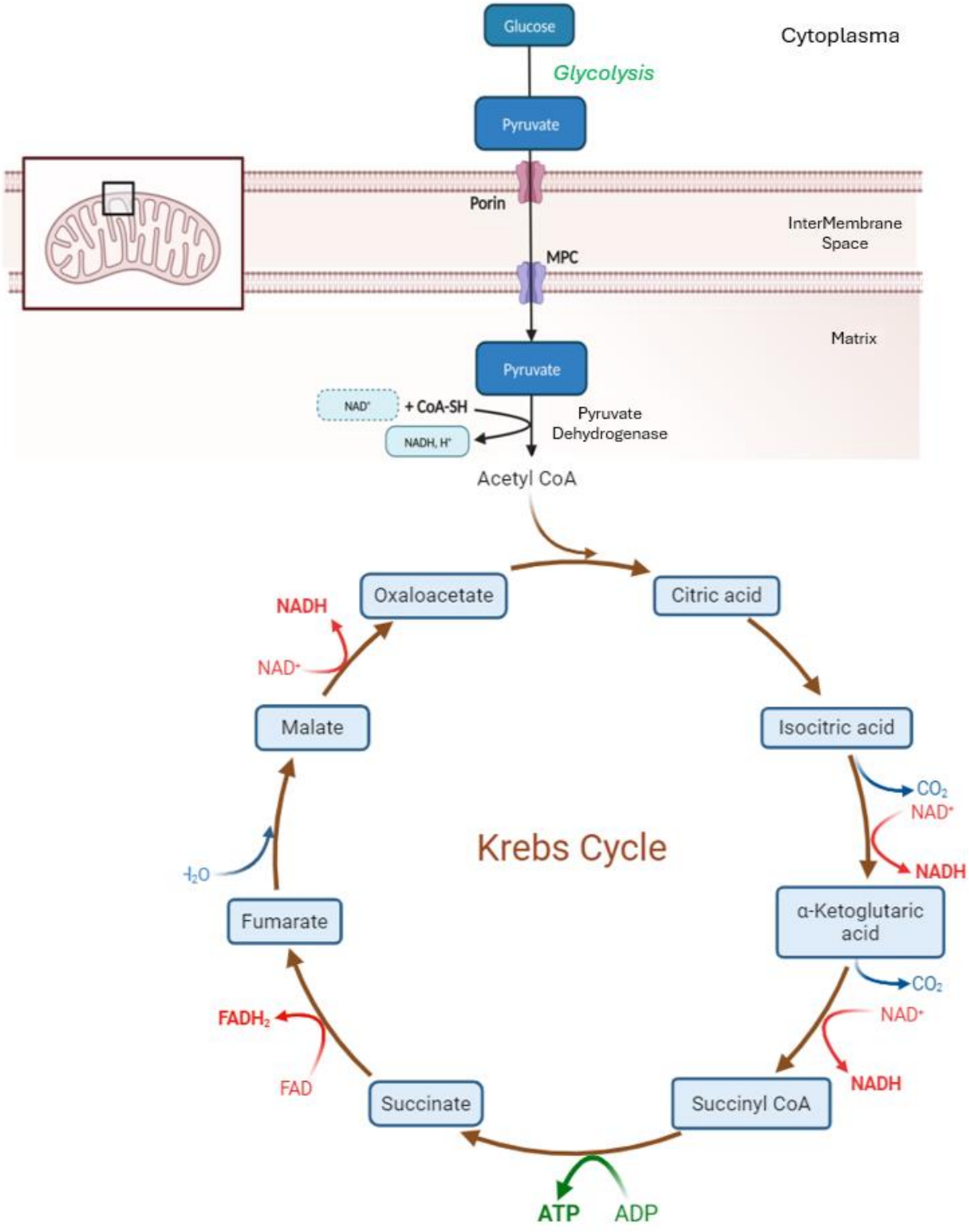


Figure 6 : Schématisation du cycle de Krebs

Ce processus implique un transfert séquentiel d'électrons à travers l'ETC d'un état réduit à un état oxydé : les coenzymes réduites NADH et $FADH_2$ sont oxydées par les complexes I et II, respectivement, et les électrons transmis au complexe III via la coenzyme Q10. Le cytochrome c facilite le transfert d'électrons entre les complexes III et IV, réduisant finalement l'oxygène moléculaire en eau.[33]

La libération d'énergie libre pendant le transfert d'électrons permet le pompage de protons (H^+) de la matrice mitochondriale dans l'IMS par les complexes I, III et IV, générant un gradient électrochimique de protons, ou Δp. Le Δp est constitué de deux éléments : un élément de charge ou potentiel de membrane mitochondriale (Δψm, généralement entre -150 et -180 mV) et un élément chimique ou gradient de pH (ΔpH).[34]

L'énergie stockée dans ces deux forces qui composent Δp entraîne la synthèse d'ATP lorsque les protons retournent dans la matrice via l'ATP synthase (**Figure 7**).[35] Le module de synthèse de l'ATP comprend non seulement l'ATP synthase, mais aussi l'Adenine Nucleotide Translocase (ANT) pour l'échange ADP/ATP et le transporteur de phosphate inorganique (PiC). En règle générale, le flux de protons est étroitement couplé à la phosphorylation. Cependant, Δp peut également être dissipé par des processus de fuite de protons[36], dans lesquels les protons retournent à la matrice indépendamment de la synthèse de l'ATP, diminuant ainsi l'efficacité de l'OXPHOS, c'est le découplage mitochondrial.

Par conséquent, Δp, en particulier son composant Δψm, est au cœur des fonctions physiologiques des mitochondries, reliant le module de synthèse de l'ATP à l'oxydation du substrat.

Les complexes de la CR ont une double origine génétique puisqu'à part CII, codé uniquement par l'ADN nucléaire, tous ont des sous-unités codées par l'ADN nucléaire et l'ADN mitochondrial (ADNmt).

L'équation finale est :

1 glucose + 6 O_2 → 6 CO_2 + 6 H_2O + **30 ATP** (sans compter la glycolyse ni le cycle de Krebs)

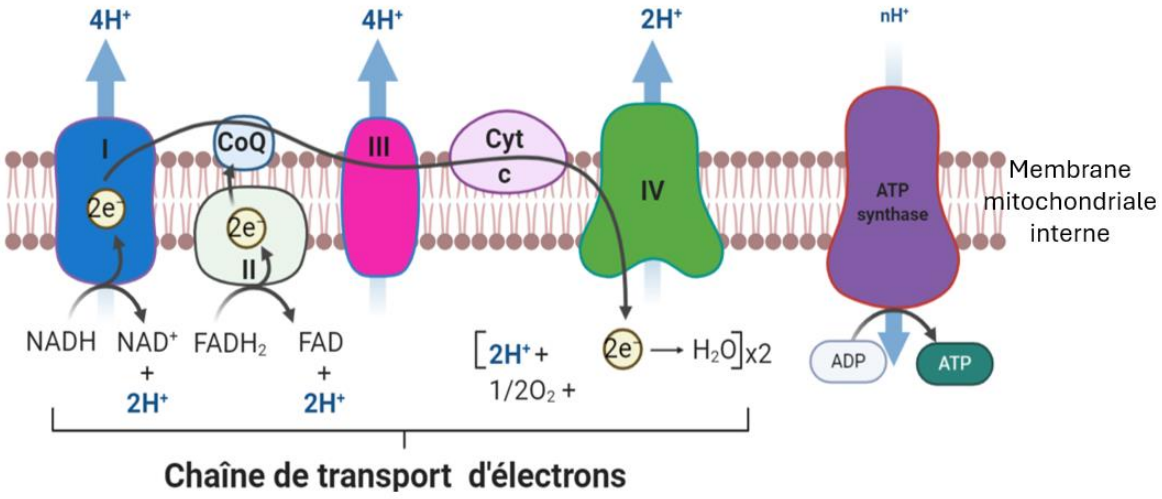


Figure 7 : Schématisation de la phosphorylation oxydative

1.3.L'ADN mitochondrial

1.3.1. Organisation

Les mitochondries ont la particularité de posséder leur propre génome, l'ADN mitochondrial (ADNmt). Cet ADNmt code 37 ARNs, dont 13 messagers, qui seront traduits en sous-unités des complexes de la CR, 22 ARNt et 2 ARN ribosomiques. L'ADNmt humain a été découvert en 1963 par Schatz-Nass[37] et séquencé pour la première fois en 1981 par l'équipe d'Anderson.[38] Révisée en 1999, la « Revised Cambridge Reference Sequence » (NC_012920) est désormais la norme pour les analyses génétiques mitochondriales chez l'homme.

Plusieurs caractéristiques distinguent l'ADNmt de l'ADN nucléaire. Même si double-brin, celui-ci est circulaire et présent en plusieurs centaines à plusieurs milliers de copies selon le type cellulaire. Il est dépourvu d'histones et d'introns et contient moins de 3 % de séquences non codantes. Il s'étend sur 16 569 pb (paires de bases) et comprend deux régions non codantes : l'une avec 1121 pb (contenant la D-loop, l'origine de réplication du brin lourd et les promoteurs de transcription LSP et HSP) et l'autre avec environ 30 pb abritant l'origine de réplication du brin léger. Ces deux origines de réplication, séparées par 11 000 pb, forment l'arc majeur (entre OH et OL) (**Figure 8**).

Le brin lourd (H) de l'ADNmt est plus riche en guanine que le brin léger (L) et la plupart des gènes de l'ADNmt sont transcrits à partir de H, à l'exception de MT-ND6 et de huit

ARNt transcrits à partir du brin léger. Certains gènes se chevauchent, comme *MT-ND4* sur *MT-ND4L*, ainsi que *MT-ATP6* sur *MT-ATP8* et il est intéressant de noter que les codons de l'ADNmt sont similaires à ceux du code universel, à 3 exceptions près (**Tableau 2**).[39]

Tableau 2 : Différences entre codes génétiques universel et mitochondrial

Codons	Code génétique universel	Code génétique mitochondrial
AGA et AGG	Arginine	Codon stop
UGA	Codon stop	Tryptophane
AUA	Isoleucine	Méthionine

L'ADNmt n'existe pas librement dans la matrice mitochondriale mais est organisé en structures protéine-ADN appelées nucléoïdes. La microscopie à super-résolution a récemment mis en lumière ces structures complexes. Les nucléoïdes sont de taille uniforme (environ 100 nm) et contiennent généralement une copie d'ADNmt chacun, bien que la moyenne soit de 1,4 copie par nucléoïde.[40] Une augmentation des copies d'ADNmt augmente le nombre de nucléoïdes sans changer leur taille.[41] La principale protéine des nucléoïdes est le facteur de transcription mitochondrial (TFAM), crucial pour la compaction des nucléoïdes, avec 1 000 molécules TFAM par copie d'ADNmt.[42] TFAM, contenant des domaines HMG, se lie à l'ADNmt, modifie sa conformation sans spécificité de séquence[43] et est nécessaire à la réplication et la transcription de l'ADNmt.[27] En effet, un KO ubiquitaire de TFAM conduit à une déplétion totale de l'ADNmt pour ensuite amener à la mort de la souris.[44] Les nucléoïdes comprennent également les protéines nécessaires à la réplication (POLG, mtSSB, Twinkle) et à la transcription (POLRMT, TFB2M, TEFM).

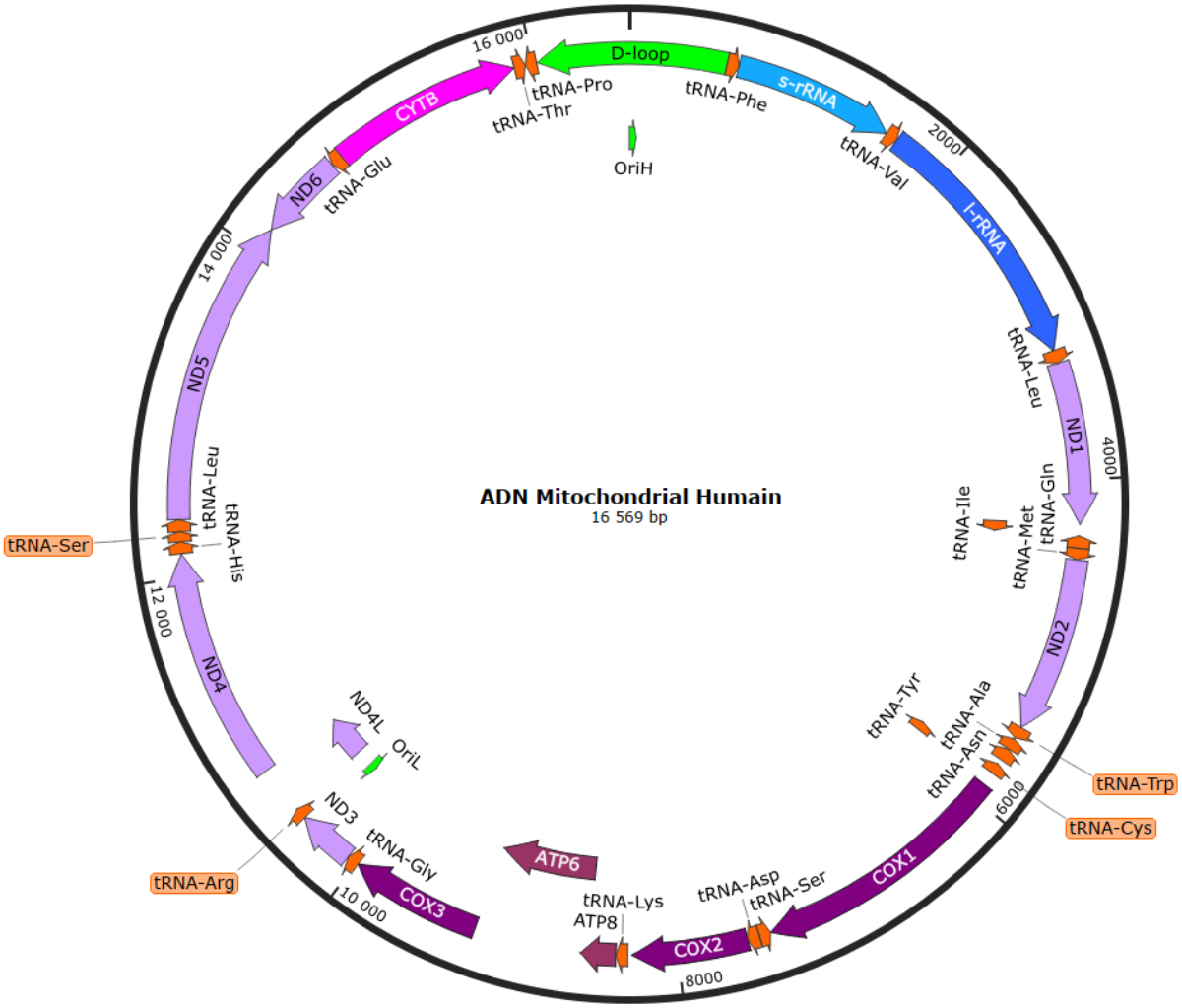


Figure 8 : Carte génétique de l'ADN mitochondrial Humain

En violet les séquences transcrites en ARNm, en bleu les ARN ribosomaux, en orange et les ARN de transfert. L'origine de réplication du brin léger (OriL), celle du brin lourd (OriH) et la boucle de déplacement (D-loop) permettant également d'initier la transcription, dans laquelle se trouve OriH, apparaissent en vert.

1.3.2. Les Direct Repeats (DR)

Les répétitions directes (DR) dans l'ADN mitochondrial (ADNmt) sont généralement de courtes séquences, souvent d'une longueur comprise entre 4 et 13 paires de bases, qui apparaissent à plusieurs endroits du génome mitochondrial. Ces répétitions jouent un rôle crucial dans les mécanismes qui conduisent aux délétions de l'ADNmt, en particulier lors de la réplication. Les DR peuvent varier en taille et sont généralement classées en fonction de leur longueur et de l'espacement entre elles. Les répétitions de 6 à 13 pb

sont le plus souvent associées à de larges délétions, en particulier lorsqu'elles flanquent des régions sujettes à la recombinaison.

Le nombre et la distribution de ces répétitions peuvent influencer de manière significative la stabilité de l'ADNmt. Par exemple, les répétitions directes comme les séquences de 13 pb situées près du site la délétion commune de 4977 pb sont très susceptibles de s'apparier lors des phases où l'ADNmt est simple brin pendant sa réplication, ce qui peut entraîner la perte de grands segments génomiques.[45]

1.3.3. Réplication

La réplication de l'ADNmt se produit indépendamment du cycle cellulaire dans la matrice mitochondriale et repose sur un complexe appelé réplisome, qui comprend plusieurs protéines codées par le noyau, synthétisées dans le cytoplasme, puis importées dans les mitochondries. Les principaux composants de ce mécanisme sont l'ADN polymérase gamma (POLγ), le facteur de Transcription Mitochondrial A (TFAM), la protéine de liaison simple brin mitochondriale (mtSSB) et l'hélicase Twinkle.

La POLγ est la seule polymérase responsable de la réplication de l'ADNmt et fonctionne comme un hétérotrimère composé d'une sous-unité catalytique POLγA et de deux sous-unités POLγB. POLγA possède un domaine exonucléase de relecture (3'-5') pour assurer une haute-fidélité dans la synthèse de l'ADN, avec un taux d'erreur *in vitro* d'un nucléotide mal incorporé pour 500 000 bases.[46] Les sous-unités accessoires POLγB améliorent l'interaction de POLγA avec l'ADN et renforcent son activité catalytique et sa précision.

Twinkle, la seule hélicase mitochondriale nécessaire à la réplication de l'ADNmt, déroule l'ADNmt double brin devant POLγ dans la direction 5'-3', facilitant la synthèse du brin néoformé.

La **protéine mtSSB**, quant à elle, protège l'ADN simple brin des nucléases et empêche la formation de structures secondaires, tout en stimulant l'activité de POLγ et Twinkle. De plus, la réplication de l'ADNmt nécessite une amorce d'ARN synthétisée par l'ARN polymérase mitochondriale (POLRMT), reliant les processus de réplication et de transcription.[47]

Bien qu'il existe plusieurs modèles proposés de réplication de l'ADNmt, le modèle de déplacement de brin est le plus largement accepté.

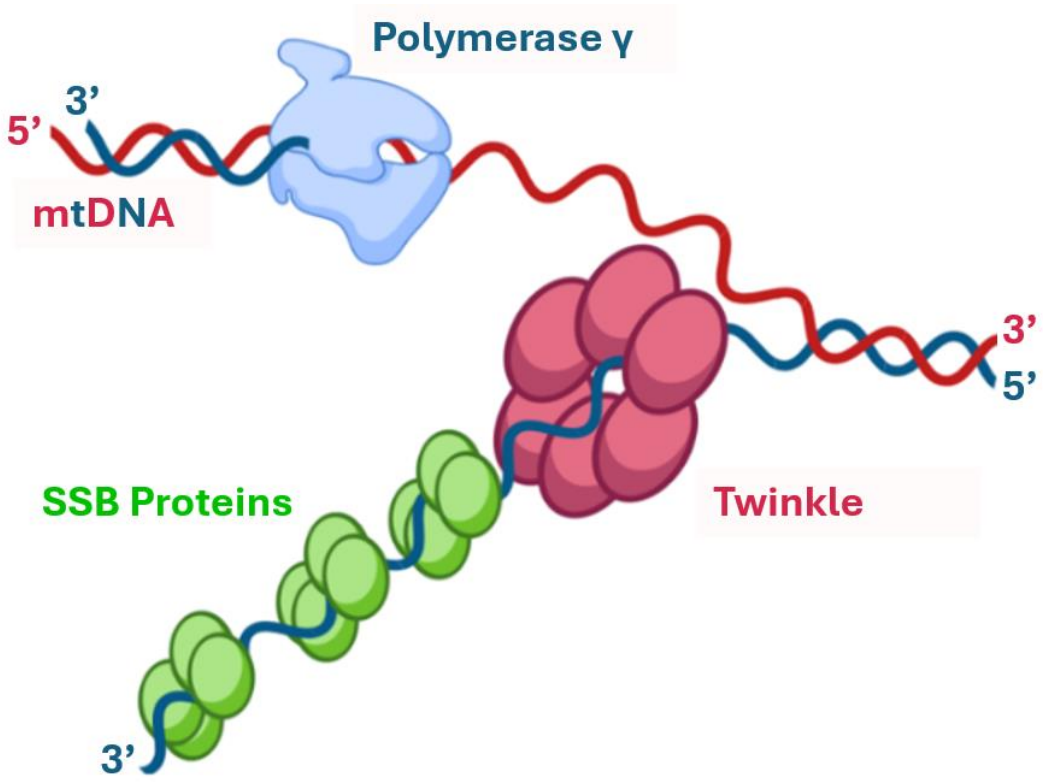


Figure 9 : Représentation du réplisome minimal mitochondrial humain

Le réplisome minimal est un complexe de plusieurs protéines indispensables pour répliquer l'ADN. Pour l'ADN mitochondrial il est composé de l'Hélicase Twinkle, de la Polymérase Gamma et des protéines liant l'ADN simple brin (Single Strand Binding, SSB).

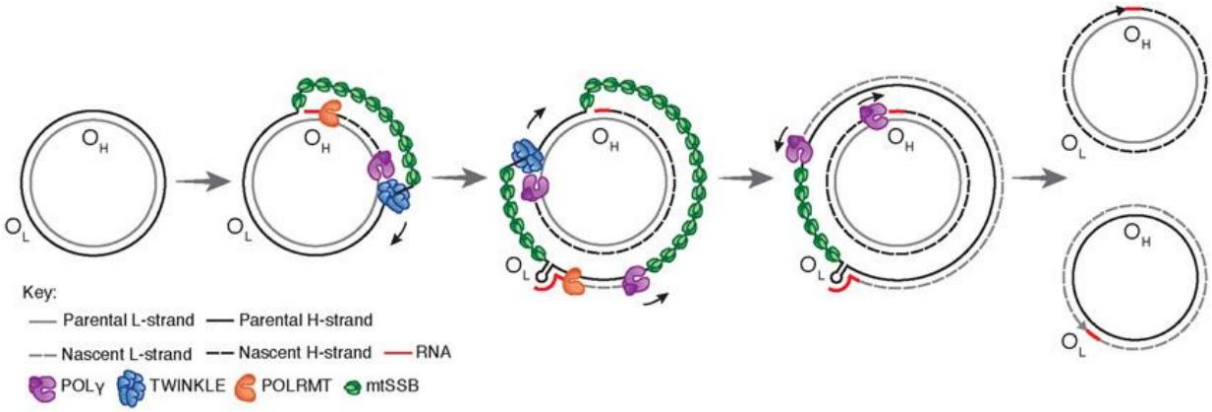


Figure 10 : Réplication de l'ADNmt d'après le modèle de déplacement de brin

De M. Falkenberg, 2018.

Dans ce modèle, la réplication commence à l'origine du brin lourd (OH), le brin principal étant synthétisé sous forme d'ADN monocaténaire. Une fois que la réplication atteint l'origine de réplication du brin léger (OL), la synthèse du deuxième brin commence dans la direction opposée. Cette réplication est continue mais asymétrique et asynchrone, une fois les deux brins synthétisés, une ligase scelle les brins d'ADN nouvellement synthétisés en molécules d'ADNmt circulaires, ce qui donne deux molécules filles, chacune comprenant un brin nouvellement synthétisé et un brin parental (**Figure 10**).[47] Cette coordination des enzymes et des protéines du réplisome assure une réplication précise de l'ADNmt, vitale pour la fonction mitochondriale et la production d'énergie cellulaire.

Oh est contenu dans une région spéciale appelée D-loop (boucle D ou de déplacement), qui contient un troisième brin d'ADN, appelé ADN 7S. Ce segment court et unique d'environ 500 à 600 nucléotides est formé dans la D-loop, la région où les deux sont temporairement séparés. La POLRMT transcrit un ARN court à partir de OH, ensuite convertie en l'ADN 7S par POLγ. Le fait que l'ADN 7S reste partiellement attaché au brin H tandis que le brin L est déplacé crée une structure tridimensionnelle, la D-loop. Cependant, la synthèse de l'ADN 7S ne s'effectue pas toujours correctement. POLγ peut mettre fin prématurément à la réplication, entraînant la formation de fragments d'ADN 7S incomplets. Ces interruptions peuvent être dues à des conditions cellulaires stressantes, à des carences en nucléotides ou à des interactions défectueuses entre les enzymes de transcription. L'ADN 7S stabilise la structure de la boucle D, facilitant le recrutement des protéines nécessaires à la réplication, telles que POLγ et Twinkle, et joue un rôle dans la régulation de la transcription des gènes mitochondriaux en modulant l'accessibilité aux promoteurs. Cependant, lorsque les restes d'ADN 7S s'accumulent en raison de la non-initiation de la réplication, cela peut perturber l'accès aux sites de réplication et altérer l'expression des gènes mitochondriaux. Une forte accumulation d'ADN 7S peut également être le signe d'un dysfonctionnement mitochondrial, indiquant un stress ou des maladies associées à des défauts de reproduction.[48]

1.3.4. Transcription

La transcription mitochondriale de chaque brin est initiée au niveau des promoteurs correspondants : HSP (Heavy Strand Promoter) et LSP (Light Strand Promoter). Elle donne naissance à des ARN précurseurs polycistroniques. L'ARN polymérase mitochondriale (POLRMT) ne peut pas initier directement la transcription à partir des promoteurs d'ADN, elle nécessite que TFAM (Facteur de Transcription Mitochondrial A) et TFB2M (Facteur de Transcription Mitochondrial B2) se lient à l'ADN mitochondrial (ADNmt) et induisent un changement de conformation au préalable.[47] L'élongation du

brin transcrit implique en outre une coopération entre POLRMT et le Facteur d'Elongation de la Transcription Mitochondriale (TEFM).

L'ensemble du génome mitochondrial code trois transcrits primaires : deux du brin H et un du brin L. Le HSP initie la transcription à partir de deux sites spécifiques : H1 et H2. H1 est situé en amont du gène *tRNA^Phe*, et son produit de transcription se termine après le gène *16S rRNA*, tandis que H2 est positionné près du gène *12S rRNA* et transcrit presque tout le brin H. La terminaison de la transcription au niveau de H1 est contrôlée par le facteur de terminaison de la transcription mitochondriale (mTERF), qui se lie à la région 3' du gène *tRNA^Leu*. En revanche, la terminaison pour H2 se produit après la région contrôle, en amont de *tRNA^Phe* (**Figure 8**), et le site de terminaison exact pour la transcription du brin L reste flou.[47]

Une fois les transcrits polycistroniques primaires formés, ils sont clivés pour libérer des ARNt, des ARNr matures et des ARNm, devenant ultérieurement polyadénylés à leurs extrémités 3', à l'exception de *MT-ND6.*[49]

1.3.5. Traduction

La traduction des 13 protéines codées par le génome mitochondrial est très similaire à celle prenant place dans le cytosol à l'exception qu'elle est réalisée par les mitoribosomes, composés d'une grande sous-unité 39S (mt-LSU) et d'une petite sous-unité 28S (mt-SSU). Alors que le génome mitochondrial code les ARNr 16S et 12S et les ARNt, le reste des composants du mitoribosome est codé par le génome nucléaire et importé dans les mitochondries.[50]

1.4. Pathologies mitochondriales

1.4.1. Contexte biologique et sociétal

Les pathologies mitochondriales représentent un groupe diversifié et complexe de troubles métaboliques relativement rares caractérisés par des anomalies génétiques qui affectent principalement le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Ces troubles peuvent résulter de mutations de l'ADN nucléaire codant pour des protéines essentielles à la fonction mitochondriale, dont la prévalence chez les adultes est estimée à 2,9 cas pour 100.000 individus. Ils peuvent également résulter de mutations de l'ADN mitochondrial (ADNmt), dont la prévalence est estimée à 9,6 cas pour 100 000 individus adultes.[51]

Les mutations de l'ADNmt peuvent affecter les gènes codant pour les sous-unités de la chaîne respiratoire, les ARNt ou ARNr. À l'inverse, les mutations de l'ADN nucléaire ciblent les gènes responsables des protéines importées dans les mitochondries qui sont cruciales pour leur bon fonctionnement, notamment celles impliquées dans les complexes de la chaîne respiratoire, les processus de fusion-fission, la réplication et la transcription de l'ADNmt. Les dysfonctionnements mitochondriaux peuvent entraîner un large éventail de symptômes cliniques affectant divers organes et tissus[52] (**Figure 11**), notamment la production d'énergie par la CR.[53]

1.4.2. Exemples

Voici quelques exemples de troubles mitochondriaux connus et importants pour cette étude[54] :

L'épilepsie myoclonique à fibres rouges déchiquetées (MERRF), est due à des mutations de l'ADNmt. La mutation 8344A>G du gène (*MTTK*) de l'ARN de transfert de la lysine (ARNt Lys) est responsable de plus de 80 % des cas dont la prévalence est de moins de 1:100.000.[55] La pathologie débute à la fin de l'enfance ou à l'adolescence et se caractérise par des secousses musculaires, des convulsions, une ataxie ainsi qu'une faiblesse musculaire. Le trouble peut entraîner des problèmes d'audition et une petite taille. Les RRFs (Ragged Red Fibres) sont des fibres musculaires prenant une teinte rouge après coloration au trichrome de Gomori.[56] Cela est dû à l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles, de telles fibres peuvent être présentes dans les tissus de patients atteints de diverses myopathies mitochondriales. (OMIM #545000).

L'Atrophie Optique Dominante (AOD) : Cette pathologie mitochondriale est liée à des mutations d'une variété de gènes tels que *OPA1*, *ACO2* et *WFS1*, par exemple.[57] L'AOD a une prévalence de 1:30.000 dans le monde et cause une dégénérescence bilatérale des nerfs optiques, provoquant une perte visuelle débutant généralement au cours de la première décennie de la vie. La maladie affecte en premier lieu les cellules ganglionnaires de la rétine (CGR) et leurs axones formant le nerf optique.[58,59] (OMIM #165500). Un projet annexe ayant pour cœur l'AOD est présenté en fin de manuscrit.

Le syndrome de Kearns-Sayre (KSS) est dû à l'accumulation de larges délétions de l'ADNmt. Sa prévalence est estimée à 1:125.000. Le KSS est souvent accompagné de PEO, débute généralement avant l'âge de 20 ans, s'accompagnant de cardiopathies, d'une limitation progressive des mouvements oculaires jusqu'à l'immobilité complète et d'un affaissement des paupières. D'autres symptômes peuvent inclure une légère faiblesse des muscles squelettiques, un bloc cardiaque, une petite taille, une perte

auditive, une incapacité à coordonner les mouvements volontaires (ataxie), une altération des fonctions cognitives et le diabète. (OMIM #530000).

L'Ophtalmoplégie Externe Progressive chronique (cPEO) a une incidence annuelle d'au moins 1:100.000.[60] Environ 60 % des cas de CPEO sont dus à des délétions de l'ADNmt. D'autres cas sont dus à des mutations de gènes du réplisome tels que *POLG1*, *ANT*, *TWNK* ou *POLG2*.[61] C'est un symptôme commun des pathologies mitochondriales qui commence généralement à l'adolescence ou au début de l'âge adulte. Elle est associée à une incapacité à bouger les yeux, une faiblesse générale du corps et une intolérance à l'exercice. (OMIM #157640).

La SANDO : (Sensory Ataxic Neuropathy with Dysarthria and Ophthalmoparesis) est généralement associée à des mutations du gène *POLG1* ou parfois *TWNK.* Elle est de prévalence inconnue et se déclare à l'âge adulte. C'est un sous-groupe de cPEO rare qui affecte principalement le cerveau, les muscles, les nerfs et les yeux. Elle est associée avec la présence de nombreuses copies de l'ADNmt présentant de larges délétions.[62] (OMIM #607459).

Actuellement, seuls les symptômes des maladies mitochondriales sont traités, ce qui fait du développement de thérapies spécifiques un défi médical important.[53]

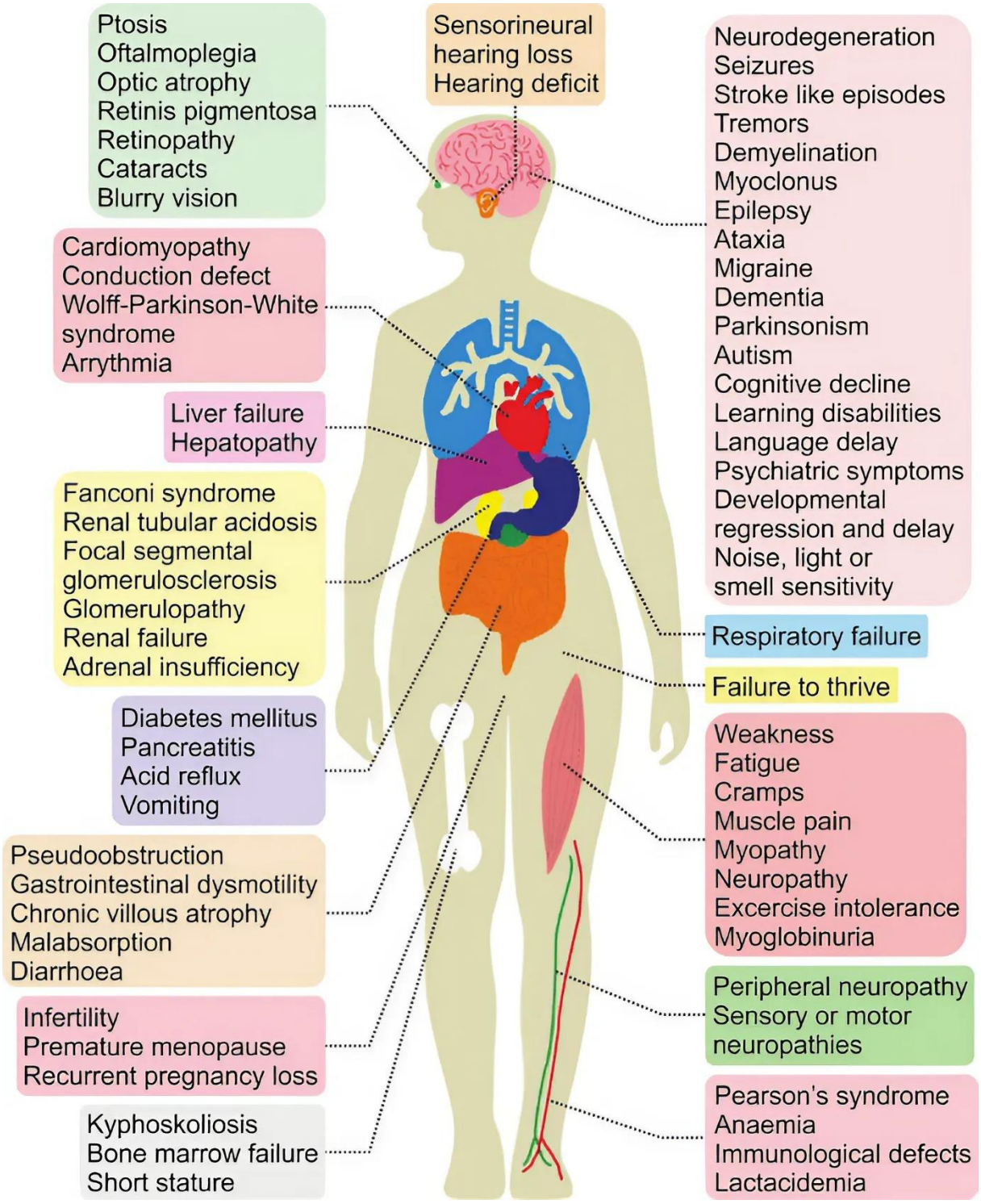


Figure 11 : Les pathologies mitochondriales en fonction du tissu touché

De E. Koňaříková *et al.*, 2020.

1.4.3. COX-déficience

Le déficit mitochondrial en COX (Cytochrome-c Oxydase, CIV de la CR) chez l'homme est une maladie mitochondriale (OMIM #220110) qui fait partie de la sous-classe des troubles de la phosphorylation oxydative, caractérisée par des défauts de biogenèse et/ou de fonction de la COX. Malgré des caractéristiques moléculaires et biochimiques communes, il existe plusieurs types différents de déficits en COX, qui sont très hétérogènes en termes de génétique, de physiopathologie et de présentation clinique. La COX-déficience au niveau cellulaire est observable grâce à une coloration liée à l'activité enzymatique de CIV, qui colore en brun les cellules fonctionnelles, et en bleu les cellules déficientes en activité respiratoire (**Figure 12**). Elle est étroitement corrélée à la perte du tissu composé des cellules qu'elle atteint et est très souvent associée à une pathologie mitochondriale telle que la cPEO, la LHON ou le syndrome de Leigh, en particulier lorsqu'elle est due à une mutation des sous-unités de la COX codées par l'ADNmt : *MT-CO1*, *MT-CO2* ou *MT-CO3*.[63]

Cette COX-déficience est en fait à la fois indice de pathologies mitochondriales mais également de réarrangement de l'ADNmt. En effet, de larges délétions de l'ADNmt sont présentes dans les tissus de patients atteints de pathologies mitochondriales telles que l'Atrophie Optique Dominante (AOD)[64] ou les cPEO, notamment le SANDO[62], mais aussi dans des cellules de différents tissus de mammifères vieillissants, sous la forme d'une mosaïque de quelques cellules COX-déficientes (COX^-) sur un fond de cellules saines. Cette observation est faite dans quelques types tissulaires à forte demande en énergie, et donc en activité mitochondriale (**Figure 13**), notamment le cœur et les muscles.[65,66]

La COX-déficience se développerait de manière locale, au niveau subcellulaire, avant de promouvoir une biogénèse mitochondriale permettant de répandre par expansion clonale les délétions à toute la cellule[67], ce qui suggère que l'hétéroplasmie devrait être considérée à ce niveau local, voire au niveau mitochondrial, plutôt qu'au niveau de la cellule ou même d'un homogénat/lysat de tissu.

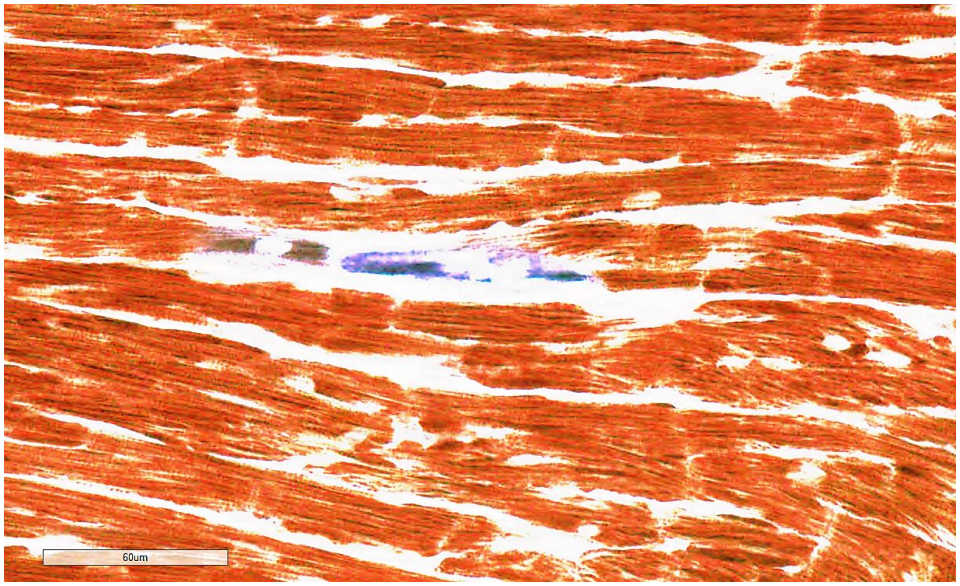


Figure 12 : Coupe d'apex de cœur de souris K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG} de 18 mois ayant subi une coloration COX/SDH

En bleu, un cardiomyocyte COX-déficient sur fond de cellules saines en brun. Le modèle de souris utilisé présente une altération de la fonction de fusion mitochondriale (*Opa1*^{delTTAG}) et accumule des délétions de l'ADNmt uniquement dans le cœur et les muscles squelettiques, induisant de la COX-déficience (K320E-Twinkle^{Myo}).[8]

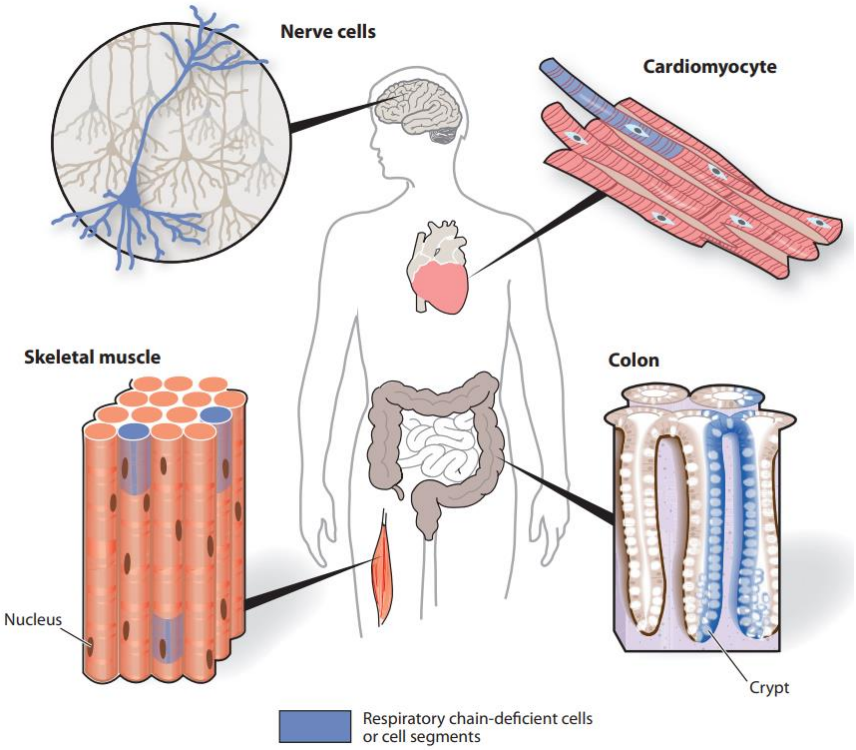


Figure 13 : Mosaïque de cellules COX-déficientes chez l'homme vieillissant

Les tissus affectés comprennent : le cerveau, le cœur, le côlon et les muscles squelettiques.
De Larsson, 2010

1.4.4. Mutations de l'ADNmt

1.4.4.1. Hétéroplasmie

Contrairement à l'ADN nucléaire, le génome mitochondrial est constitué de plusieurs copies par cellule et si une mutation de l'ADN nucléaire peut se présenter sous forme homozygote (100 %) ou hétérozygote (50 %), ce concept diffère pour l'ADNmt, décrit en termes d'homoplasmie et d'hétéroplasmie. L'hétéroplasmie fait référence à la coexistence de molécules d'ADN de type sauvage et muté, tandis que l'homoplasmie indique la présence du même type de molécule d'ADNmt dans toutes les cellules (soit sauvage, soit porteuse de la même mutation). Le phénotype pathologique d'une maladie mitochondriale est influencé par le seuil d'hétéroplasmie, défini comme le pourcentage d'ADNmt muté. En général, ce seuil se situe autour de 60 % pour les délétions et entre 80 et 90 % pour les mutations ponctuelles avant que le phénotype clinique ne devienne apparent.[68,69] Cependant, le seuil critique de l'hétéroplasmie peut varier en fonction de la mutation, du type de cellule et des facteurs propres au patient.[53]

Les altérations du génome mitochondrial se répartissent en trois catégories principales : la déplétion, les grands réarrangements et les mutations ponctuelles.

1.4.4.2. Déplétion de l'ADNmt

La déplétion de l'ADNmt fait référence à une réduction sévère du nombre de copies des dans les cellules, souvent causée par des mutations dans les gènes nucléaires qui sont essentiels au maintien ou à la réplication de l'ADN mitochondrial.[70] Les syndromes de déplétion de l'ADN mitochondrial (ADNmt) (MDS) sont un groupe hétérogène de maladies génétiques autosomiques récessives rares caractérisées par une diminution du nombre de copies d'ADNmt à l'intérieur de l'organe concerné. Il existe trois formes distinctes de MDS, à savoir les formes hépato-cérébrale, myopathique et encéphalomyopathique. La diversité du spectre clinique et génétique de ces troubles rend leur diagnostic difficile[71], c'est pourquoi des modèles d'études comme des KO de TFAM[44] ou la souris « depleter »[72] ont été développés.

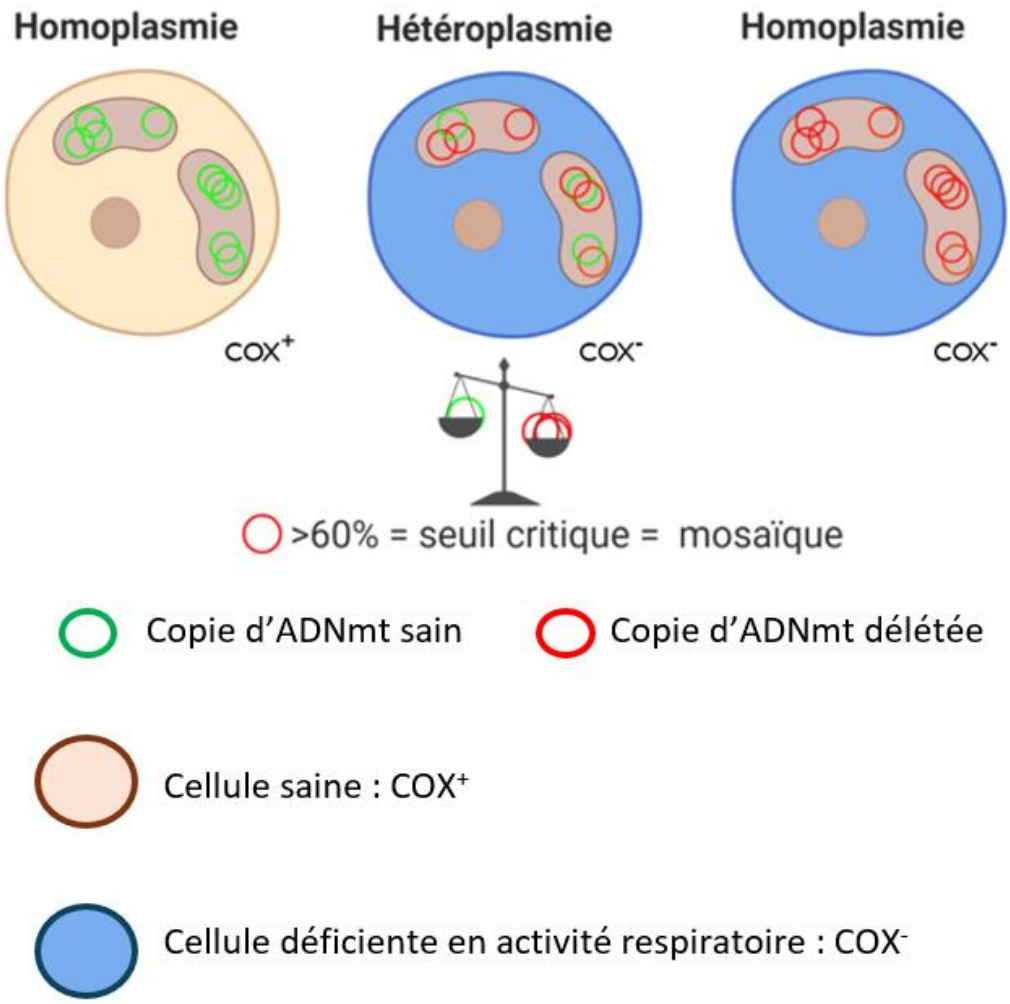


Figure 14 : Notion d'hétéroplasmie

Il y a, au sein d'une même cellule, de nombreuses copies de l'ADNmt pouvant présenter des mutations ponctuelles ou des délétions, dans ce dernier cas on considère que si 60 % des copies d'ADNmt sont atteintes, alors un seuil critique et pathologique est franchi. La mitochondrie ne code alors plus correctement les protéines de la chaîne respiratoire, la COX devient donc inactive et la cellule COX^-. Ce partage entre copies saines et altérées est un état d'hétéroplasmie, nomination opposée à « homoplasmie » qui désigne un état où toutes copies sont identiques (saines ou altérées).

1.4.4.3. Mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles se présentent de manière stochastique ou associée à une dysfonction d'un élément de la machinerie réplicative ou transcriptionnelle de l'ADNmt, de la même manière que l'ADN génomique. Elles peuvent affecter les gènes codant pour les protéines de la chaîne respiratoire, les ARNt et ARNr mais ne sont pas forcément pathogènes. Aujourd'hui, de nombreuses mutations ponctuelles pathogènes ont été répertoriées dans la base de données Mitomap, 43 dans les gènes codant pour des sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire, 50 dans les ARNt et 2 dans les ARNr.

Ces mutations peuvent induire des pathologies mitochondriales comme le MELAS, la LHON ou encore la MERRF.[73]

Un modèle de souris a été développé pour étudier l'impact de ces mutations ponctuelles, la souris *Polg*^{D257A} ou « mutator ».[74]

1.4.4.4. Duplications

Les grands réarrangements de l'ADNmt se composent principalement de délétions et de duplications. Selon la base de données Mitobreak, plus de 44 duplications ont été documentées. Lors d'une duplication, l'ADNmt devient plus grand que la normale en raison de la présence d'une région dupliquée disposée en tandem par un mécanisme dépendant, comme celui à l'origine des délétions, des séquences répétées de l'ADNmt (**Figure 15**). Et bien que la pathogénicité de ces duplications ne soit pas entièrement prouvée, elles pourraient potentiellement provoquer des protéines anormales en raison de la fusion de gènes ou interférer avec la transcription de l'ARNt.[75]

Il n'existe, à ce jour pas de modèle de souris spécifique de l'étude des duplications de l'ADNmt mais celles-ci sont souvent associées aux délétions.

1.4.4.5. Délétions

Selon la base de données Mitobreak, il existe plus de 1 300 délétions, c'est-à-dire des pertes d'un segment de l'ADN mitochondrial conduisant à une copie circulaire plus petite. Les délétions dans l'ADNmt peuvent se former par « recombinaison par choix de copie » ou après une cassure double brin.

Au cours de la recombinaison par choix de copie, qui est basée sur le modèle de réplication par déplacement de brin, la réplication de l'ADNmt commence à OH et se poursuit vers OL, où commence la synthèse du brin L naissant. Lorsque la répétition la plus proche d'OL, marquée comme répétition 3', est déplacée du brin H modèle, elle peut se ré-hybrider à la répétition la plus proche d'OH, marquée comme répétition 5', sur le brin H modèle. Après le premier tour de réplication, il y aurait une molécule d'ADNmt de type sauvage complète et une molécule d'ADNmt abritant à la fois un brin d'ADNmt de type sauvage et un brin portant une délétion.

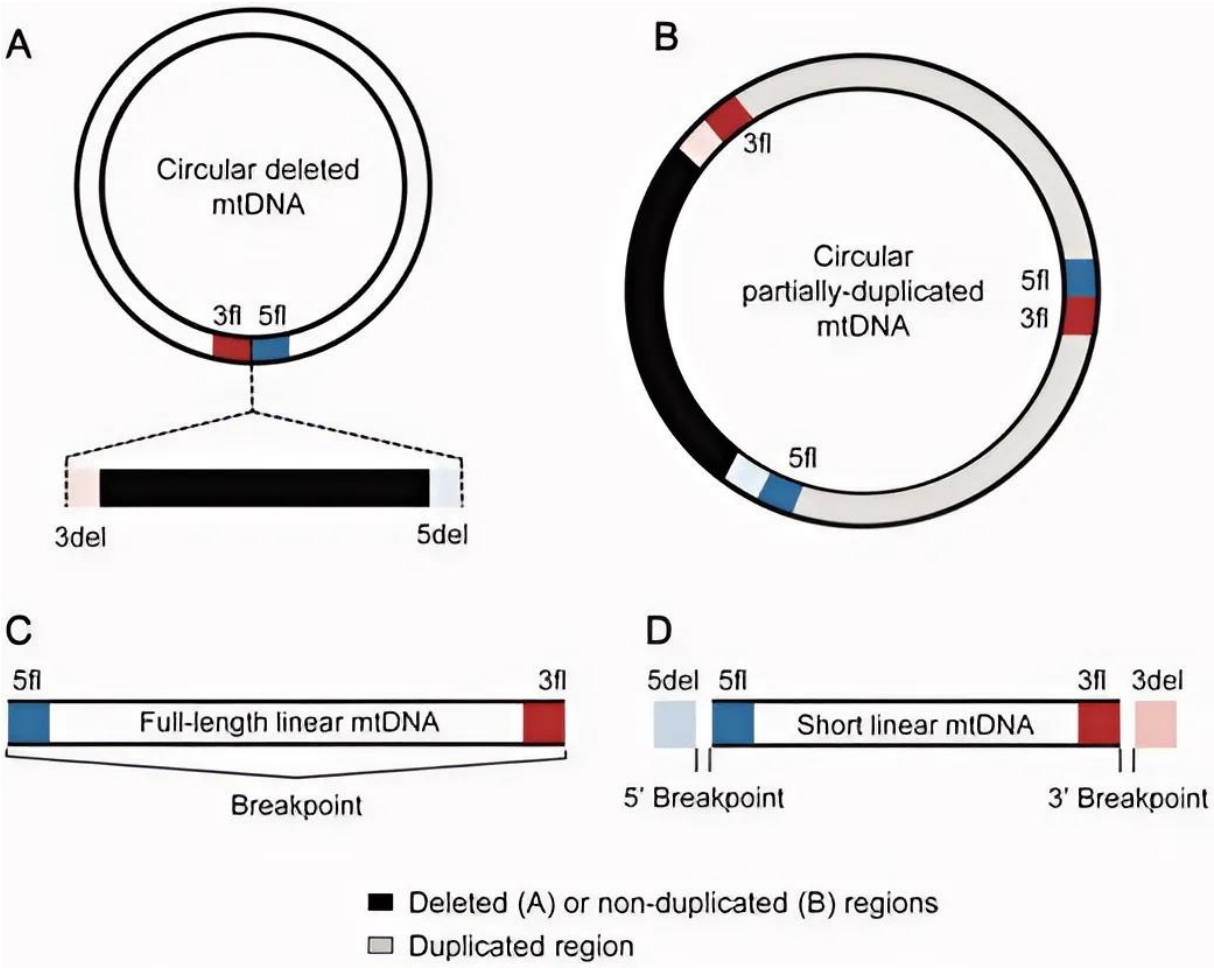


Figure 15 : Représentation schématique d'une molécule d'ADNmt délétée ou dupliquée

A) ADNmt circulaire, **B)** partiellement dupliqué, **C)** linéaire sur toute la longueur et **D)** linéaire court. Les premier (5') et deuxième (3') points de cassure dans le brin L de l'ADNmt de référence définissent une délétion ou une duplication de l'ADNmt, ils sont situés entre deux Direct Repeats. Les régions proximales conservées du point de cassure 5' (5fl ; flanquant 5' ; section bleu foncé) et du point de cassure 3' (3fl ; flanquant 3' ; section rouge foncé) se trouvent dans les délétions et les duplications de l'ADNmt (se produisant deux fois dans l'ADNmt dupliqué). Les régions proximales du point de cassure 5' (5del ; 5' supprimé ; section bleu clair) et du point de cassure 3' (3del ; 3' supprimé ; section rouge clair) sont éliminées dans les délétions de l'ADNmt. L'ADNmt linéaire complet est défini par un seul point de cassure et ne comporte aucune section éliminée. Les ADNmt linéaires plus courts sont définis par deux points de rupture. De J. Damas *et al.*, 2014.

Un cycle de réplication ultérieur conduit à une molécule d'ADNmt de type sauvage et à une molécule d'ADNmt délétée (ΔADNmt), où le point de rupture est flanqué de répétitions directes (**Figure 17 A**).[76]

Après une cassure double-brin, l'ADNmt est soit rapidement dégradé par les membres de la machinerie de réplication de l'ADNmt (notamment POLG, MGME1 et Twinkle), soit seulement partiellement dégradé, les extrémités libres pouvant se joindre et pouvant

former une molécule ΔADNmt. Ce point de cassure de la molécule ΔADNmt n'est généralement pas flanqué de répétitions directes (**Figure 17 B**).[76]

Il existe des délétions simples et multiples, qui se concentrent pour la plupart sur l'arc majeur de l'ADNmt[77] (la partie la plus large entre les deux origines de réplication). Les délétions multiples impliquent plusieurs délétions de tailles variables chez le même individu, résultant souvent de défauts génétiques nucléaires, affectant le maintien ou la réplication de l'ADNmt.

Les délétions simples sont quant à elles sporadiques et varient considérablement en taille et en emplacement, elles peuvent s'accumuler dans certaines cellules par expansion clonale, faisant varier l'hétéroplasmie de différentes cellules au sein d'un même tissus.

Ces délétions se retrouvent également dans les tissus de personnes très âgées tels que les muscles ou le cœur[78], en particulier la délétion commune de 4977 pb située entre les gènes MT-ATP8 et MT-ND5.[79] Chez l'homme, les données issue d'analyse NGS montrent une forte variation de ces délétions, notamment dans les muscles[80], certaines étant plus communes que d'autres. C'est également le cas chez la souris, comme le montre une étude de 1995 présentant le spectre de délétions retrouvées dans plusieurs tissus chez les souris âgées, dont 3 sont retrouvées plus fréquemment : 9089-12976, 9554-13299 et 1100-4934 (**Figure 16**).[81]

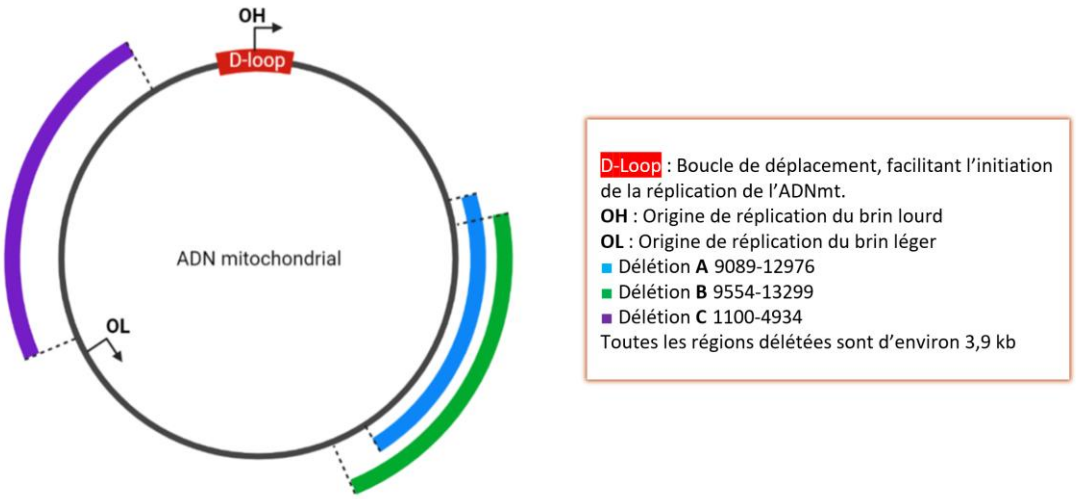


Figure 16 : Emplacement des différentes délétions ciblées sur l'ADNmt

Ce type de délétion peut également être identifié dans les tissus de patients souffrant de pathologies mitochondriales telles que le SANDO ou les Atrophie Optique Dominantes pouvant être induites par des mutations de *OPA1*, *POLG* ou encore *TWNK*.[82]

Il existe plusieurs modèles d'étude des délétions de l'ADNmt. Le premier, Mito-Mouse[83], exprime de manière clonale une seule délétion comme ce qui est souvent le cas lors du vieillissement.[78] La seconde est la souris Deleter, qui présente une mutation de Twinkle retrouvée chez des patients souffrant de cPEO.[84] La dernière est K320E-Twinkle, dérivée en plusieurs modèles tissus-spécifiques, notamment K320E-Twinkle^{Myo}, qui accumule des délétions de l'ADNmt dans le cœur et les muscles squelettiques.[8] K320E est une mutation retrouvée chez des patients SANDO (K319E chez l'homme).[85]

1.5.Twinkle

1.5.1. Structure

Twinkle est une hélicase mitochondriale découverte en 2001[86], dont le gène correspondant est encore parfois aujourd'hui identifié comme *C10orf2*, car celui-ci débute au deuxième cadre de lecture ouvert (Open Read Frame, ORF) du chromosome 10.

Ce gène est actuellement nommé *TWNK* (locus 10q24.31, Uniprot Q96RR1)

Les hélicases sont un groupe diversifié de protéines motrices qui utilisent l'énergie de l'hydrolyse de nucléotides triphosphates (NTP) pour catalyser le déroulement des duplex ADN. Elles sont impliquées dans la réplication[47], la transcription[49], la traduction[50], la recombinaison et la réparation de l'ADN.[87]

Twinkle est généralement représentée sous forme hexamérique (**Figure 18**) même si elle existe aussi sous forme heptamérique, comme cela a été observé en cryo-microscopie électronique.[88] Une forme octamérique a été observée[89] lorsque la mutation W315L est présente chez des patients atteints de cPEO.[90] Chaque monomère de 72 kDa est composé d'un domaine N-terminal (NTD) et d'un domaine C-terminal (CTD) reliés par une hélice de liaison flexible.

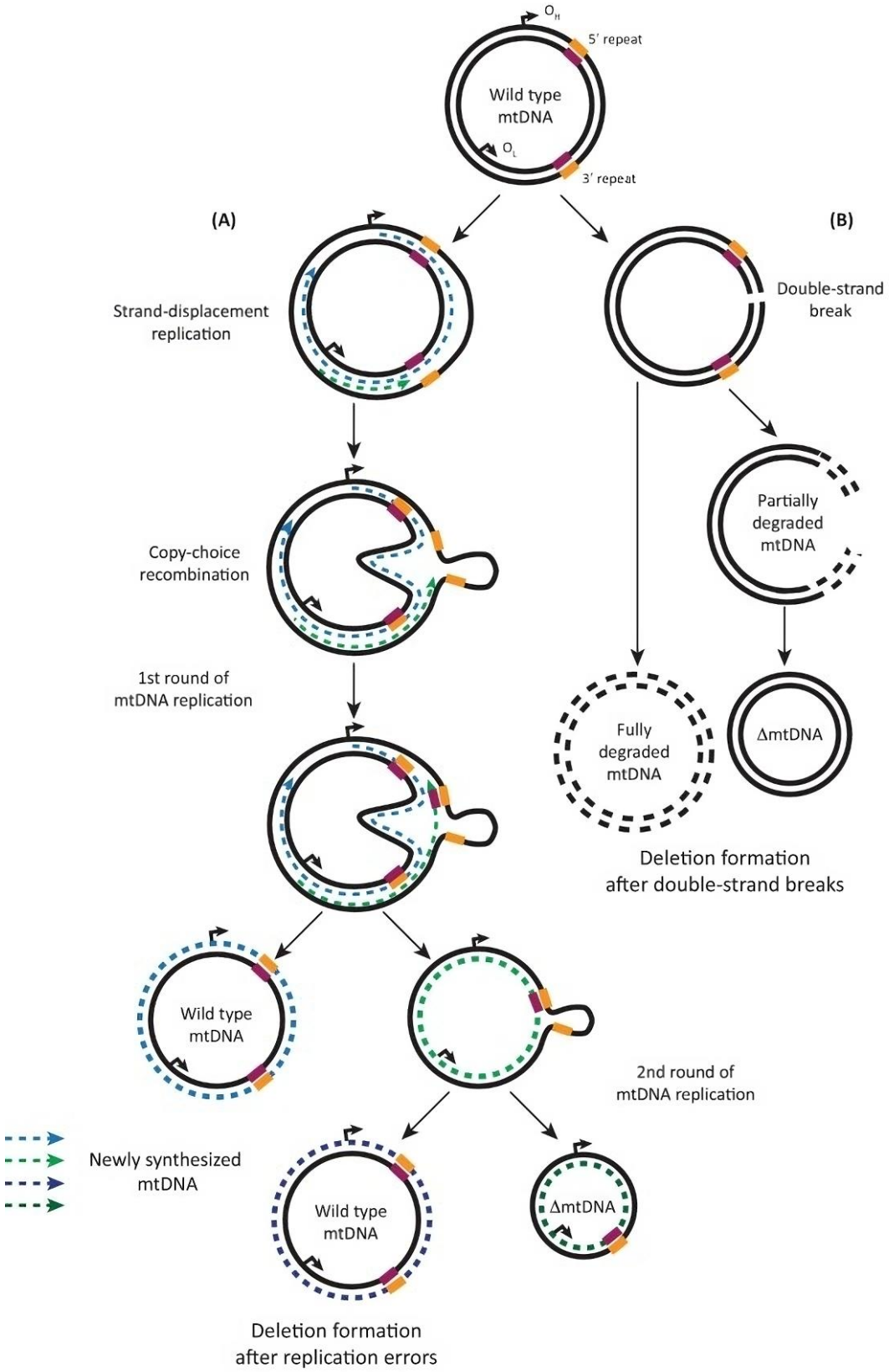


Figure 17 : Formation des délétions de l'ADNmt

A) Recombinaison par choix de copie d'ADNmt. **B)** Ré-appariement après cassure double-brin. De Nissanka *et al*., 2019.

Sur la base de similitudes de structure et de séquence, les hélicases peuvent être classées en six superfamilles (SF1-6) et Twinkle fait partie de la superfamille SF4, elle est étroitement liée à la primase-hélicase de la protéine 4 du gène du bactériophage T7 (gp4).[91] Twinkle est ainsi composée d'une MTS, d'un domaine primase-like non-fonctionnel et d'une hélice liant cette partie avec le domaine hélicase qui suit (**Figure 18**). Cette hélice n'a pas d'activité enzymatique mais des mutations dans sa séquence peuvent altérer et ralentir la progression de l'hélicase lors de l'ouverture de la fourche de réplication.[92] De plus, les hélicases SF4 sont en forme d'anneau et partagent des motifs conservés, notamment Walker A, qui stabilise le phosphate NTP ainsi que Walker B, qui contient un doigt d'arginine requis pour la stabilisation du NTP et d'un ion Mg^{2+} liés. Dans T7 (gp4), le NTD fonctionne comme une primase en plus de son rôle d'hélicase. Ici, un domaine de liaison au zinc (ZBD) se lie à l'ADNsb et le transfère au domaine de l'ARN polymérase (RPD), qui catalyse ensuite l'ajout de NTP. Le NTD de Twinkle, cependant, a perdu l'activité primase à la suite d'une évolution divergente. Dans les mitochondries des mammifères, cette fonction primase a été reprise par l'ARN polymérase mitochondriale POLRMT.[93]

1.5.2. Pathologies associées aux mutations de *TWNK*

Twinkle est un élément critique du réplisome, non seulement parce que le déroulement de la double hélice d'ADNmt est indispensable à sa réplication, mais aussi parce que des mutations altérant sa fonction auront pour conséquence de rendre l'ADNmt simple brin plus vulnérable et accessible aux mutagènes au sein de la fourche de réplication. Ainsi, avant même la découverte du gène codant pour Twinkle, plusieurs mutations ont été identifiées sur le chromosomes 10, dans le locus qui lui correspond, chez des patients atteints de adPEO (PEO autosomale dominante).[94] En 2001, ce sont 11 mutations de Twinkle qui sont imputées à des adPEO.[91] Par la suite, la diversité des pathologies liées à des mutations de Twinkle s'accroit, la mutation K319E étant notamment identifiée comme un des responsables du SANDO[85] et la mutation Y508C responsable du IOSCA[95] (Infantile Onset SpinoCerebellar Ataxia) en 2005.[71] Depuis, de nombreuses mutations de Twinkle ont été identifiées chez des patients souffrant des pathologies mitochondriales précédemment citées, du syndrome de Perrault, MDS ou encore des hépatopathies (**Figure 20**).

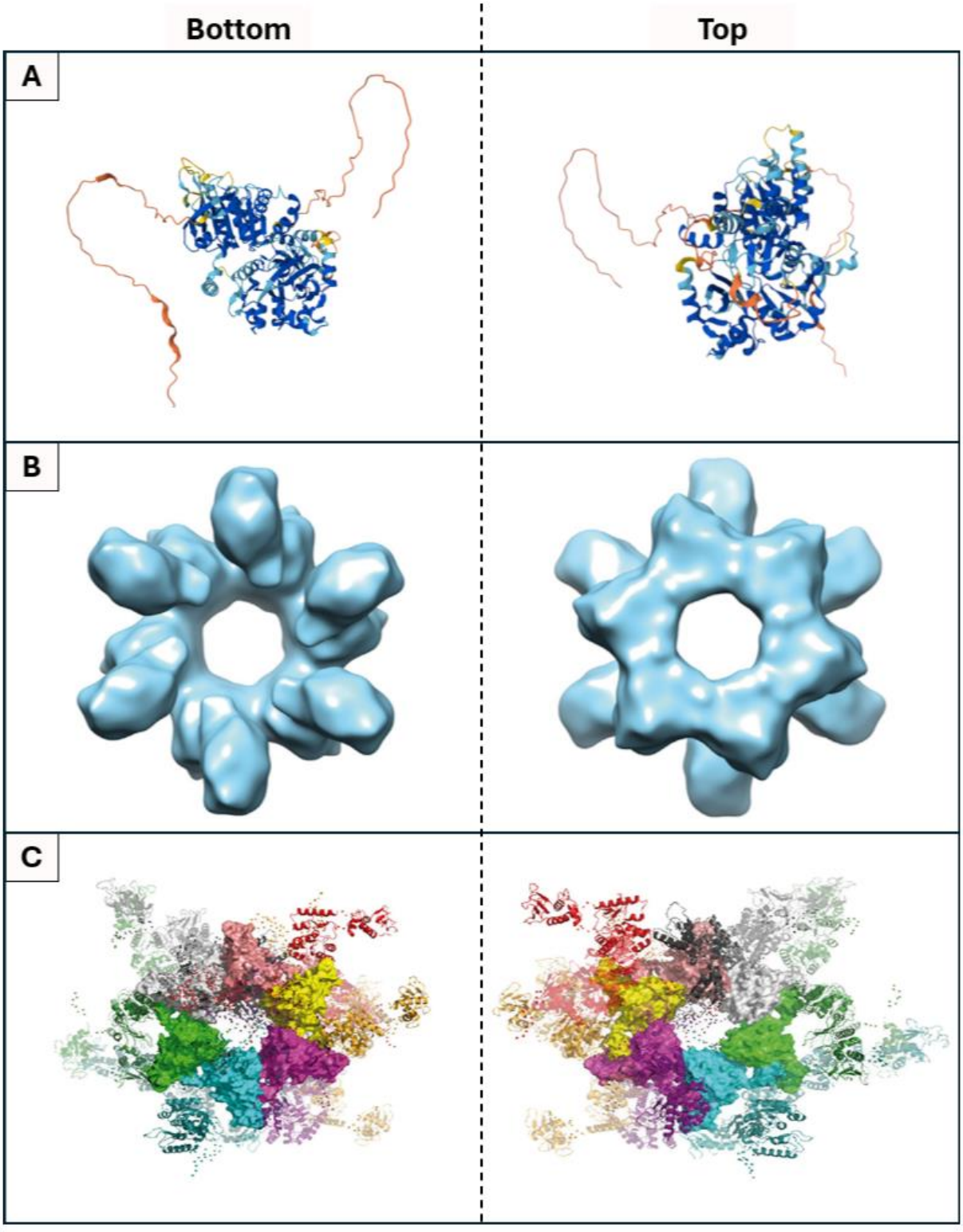


Figure 18 : Structure hexamèrique de l'hélicase mitochondriale Twinkle

A) Prédiction de la structure d'un monomère de Twinkle obtenue sur AlphaFold, plus la couleur est froide, plus la probabilité que la conformation soit exacte est élevée. **B)** Structure hexamèrique de l'hélicase Twinkle reconstituée à partir des observations effectuées en cryo-microscopie électronique (Cryo-EM). P. Fernàndez-Millàn *et al.*, 2015. **C)** Reconstitution de la structure de la protéine Twinkle sous forme d'hexamère à partir des résultats de Cryo-EM.[88] P. Fernàndez-Millàn *et al.*, 2015.

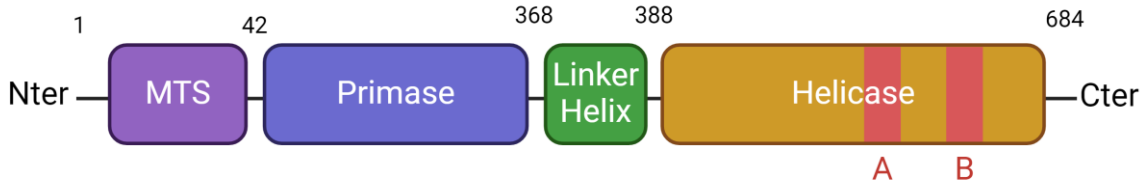


Figure 19 : Schématisation de l'organisation des domaines de la protéine Twinkle

MTS : Mitochondrial Targetting Sequence, clivée à l'import mitochondrial. Le domaine primase n'est pas fonctionnel. Le domaine hélicase présente les deux motifs conservés chez la famille d'hélicases SF4 : Walker A et Walker B, représentés en rouge.

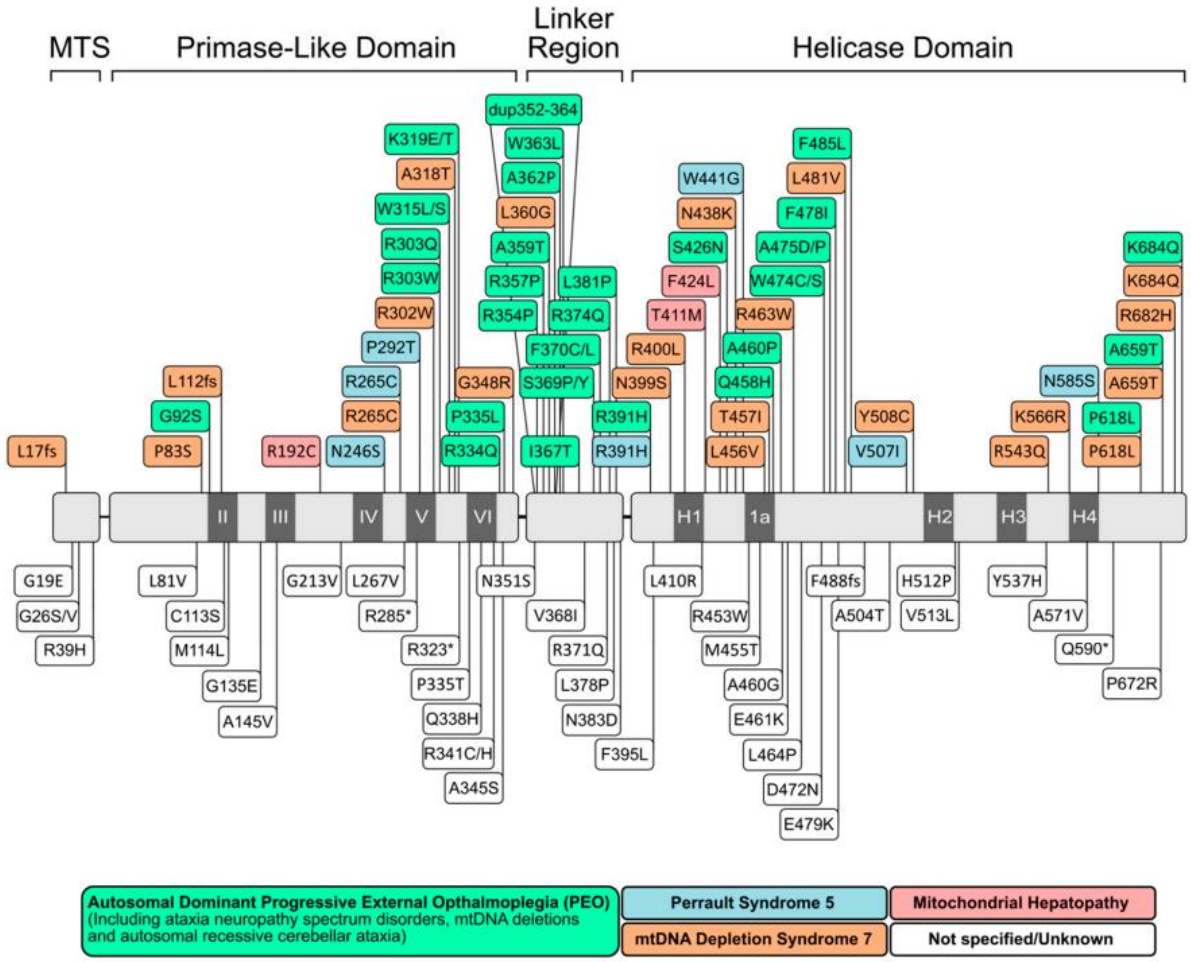


Figure 20 : Mutations de *TWNK* connues et pathologies associées

Peter & Falkenberg, 2020

1.6. Les contrôles-qualité de l'ADN mitochondrial

1.6.1. Systèmes de réparation moléculaire

Comparés aux mécanismes largement étudiés de réparation de l'ADN nucléaire, ceux de l'ADNmt sont moins bien compris. Pendant de nombreuses années, il était d'usage de penser que les mécanismes de réparation de l'ADN pourraient ne pas être présents ou nécessaires dans les mitochondries car contrairement à l'ADN nucléaire, l'ADNmt est multicopie. Ainsi une hypothèse a émergé, selon laquelle l'ADNmt endommagé était simplement dégradé sans être réparé, tandis que l'ADNmt non endommagé servait de modèle pour la synthèse de nouvelles molécules d'ADNmt.[96] Cette hypothèse était principalement basée sur les expériences montrant que les dimères de pyrimidine induits par les UV n'étaient pas réparés dans les mitochondries des mammifères.[97] Étant donné que la réparation par excision de nucléotides (NER) est une voie très efficace pour corriger une variété de dommages environnementaux tels que ceux induits par les UV[98], ces données suggèrent que la NER est absente pour la réparation des dommages à l'ADNmt.

Cependant, de plus en plus d'études montrent que d'autres voies de réparation de l'ADN, notamment la réparation par excision de base (BER), l'inversion directe (DR), la réparation des mésappariements (MMR) et peut-être la réparation des cassures double brin (DSBR), existent dans les mitochondries des mammifères.[99,100]

1.6.1.1. Réparation par excision de bases (BER)

La BER est hautement conservée des bactéries à l'homme et a été considérée comme la principale voie de réparation dans les mitochondries, responsable de l'élimination des lésions d'ADN causées principalement par l'oxydation, l'alkylation, la désamination et la méthylation.[99,101] Son processus de base comprend la reconnaissance et l'élimination des bases d'ADN endommagées, laissant un site abasique qui est clivé par des glycosylases et traité par l'endonucléase APE1 ou la polynucléotide kinase/phosphatase (PNKP) pour enfin être comblé et ligaturé, complétant ainsi la BER.[101,102]

La voie de réparation des cassures simples (SSBR) est également susceptible d'être présente dans les mitochondries.[103] La SSBR peut être considérée comme une forme de BER, car de nombreuses protéines impliquées dans la BER sont importantes pour la SSBR et les deux voies ont des étapes communes.

1.6.1.2. Réparation des mésappariements (MisMatch Repair, MMR)

En 2003, une activité MMR dans des extraits mitochondriaux de foie de rat a été rapportée.[104] Elle pourrait dépendre de la protéine YB-1 car sa déplétion entraîne à la fois une diminution de l'activité MMR dans les extraits mitochondriaux et une augmentation des taux de mutations de l'ADNmt[105] mais des recherches supplémentaires sont nécessaires pour mieux caractériser son mécanisme détaillé, en particulier le ou les cofacteurs mitochondriaux associés à YB-1 impliqués dans ce processus.

1.6.1.3. Réparation des cassures double brin (DSBR)

Les cassures double brin (DSB) sont les lésions d'ADN les plus cytotoxiques si elles ne sont pas réparées efficacement, et elles peuvent être induites par les ROS, le blocage de la réplication ou les radiations. Dans le noyau, les DSB sont principalement réparées par deux voies, notamment la recombinaison homologue (HR) et les voies de jonction d'extrémités non homologues (NHEJ).[102] La HR est considérée comme une voie de réparation « sans erreur » en raison de son utilisation d'un partenaire homologue comme modèle pour réparer les lésions de l'ADN. Plusieurs preuves soutiennent la présence de HR dans les mitochondries, notamment les intermédiaires de recombinaison détectés dans les mitochondries humaines[106], et la présence de Rad51, un homologue de RecA, induisant la HR génomique.[107]

1.6.2. La dynamique mitochondriale

1.6.2.1. Généralités

Les mitochondries forment un réseau dynamique. Elles changent constamment de taille et de nombre par le biais de deux processus opposés : la fission et la fusion, les deux pendants de ce que l'on nomme la dynamique mitochondriale. L'équilibre entre fission et fusion est essentiel au maintien de la fonction mitochondriale, et il est étroitement régulé pour préserver une capacité respiratoire saine pour des cellules fonctionnelles, en particulier dans les tissus exigeants en énergie, qui regorgent de mitochondries.

Les protéines majeures impliquées dans la fusion et la fission mitochondriale sont des dynamines, des GTPases de haut poids moléculaire.[108]

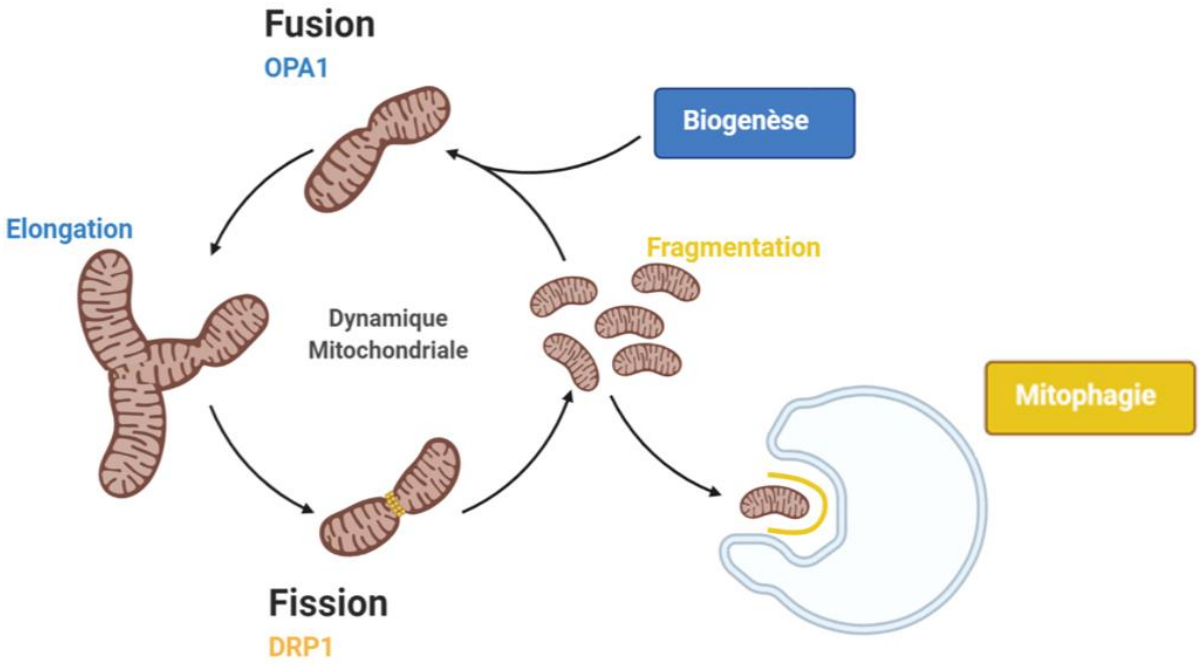


Figure 21 : Schématisation des mécanismes impliqués dans la dynamique mitochondriale

La dynamique mitochondriale est une balance finement régulée entre la fusion des mitochondries initiée par la dynamine OPA1, participant au partage de contenu ainsi qu'à à la biogénèse mitochondriale, et la fission des mitochondries, initiée par DRP1, permettant la dissémination des mitochondries dans la cellule et l'élimination de fragments mitochondriaux séparés du réseau par activation d'une autophagie sélective : la mitophagie.

1.6.2.2. La fusion mitochondriale

1.6.2.2.1. Principe de la fusion mitochondriale

La fusion des mitochondries est utile pour l'homéostasie calcique ou le partages d'autres éléments intra-mitochondriaux[109] mais est aussi la première réponse à un stress mineur, l'objectif étant de partager les dommages afin de les diluer dans le réseau, notamment ceux à l'ADNmt, pour empêcher le franchissement du seuil critique d'hétéroplasmie.[110] La succession rapide d'un événement de fusion avec un événement de fission (kiss and run) pourrait également permettre une sorte de contrôle de l'homéostasie mitochondriale en situation normale.[111] La fusion est gérée par un trio de dynamines : les mitofusines 1 et 2 (MFN1/2) pour la membrane externe et OPA1 pour la membrane interne.

1.6.2.2.2. MFN1 et MFN2

MFN1 et MFN2 partagent environ 80 % de similarité de séquence. Chez l'homme, elles sont codées par les gènes nucléaires *MFN1* (locus 3q25-q26, Uniprot Q8IWA4) et *MFN2* (locus 1p36.22, Uniprot O95140).

Les protéines MFN1 et MFN2 sont hautement conservées ont été initialement décrites chez Drosophila melanogaster, où une seule protéine joue leur rôle en facilitant la fusion des membranes externes, sous le nom de Fzo1 (Fuzzy onion 1)[112]. MFN1 est une protéine de 741 acides aminés, partageant 60 % d'homologie avec MFN2, qui se compose de 757 acides aminés. Elles contiennent un domaine GTPase N-terminal faisant face au cytosol, deux régions hydrophobes (HR1 et HR2) ainsi que deux domaines transmembranaires (TM) (**Figure 22**).

Les protéines MFN sont en forme de V, ancrées dans l'OMM par leurs deux TM.[113] La liaison du GTP aux domaines GTPase provoque un réarrangement des protéines MFN, initiant la fusion des membranes mitochondriales externes.[114] Il a été démontré qu'une surexpression des Mitofusines conduit à l'agrégation mitochondriale autour du noyau[115] tandis que la déplétion en MFN1 induit une fragmentation mitochondriale.[116]

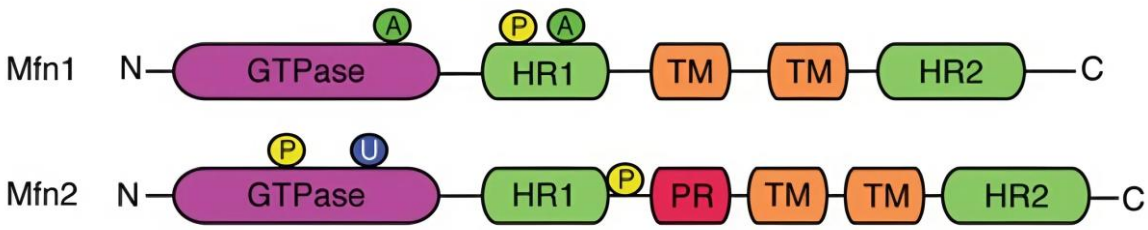


Figure 22 : Domaines structuraux des Mfns

HR : Répétitions Heptadiques. TM : domaines TransMembranaires. PR : région Riche en Prolines. P : site de Phosphorylation. U : site d'Ubiquitination. A : site d'Alkylation. N : région N-terminale. C : région C-terminale. Tilokani *et al.*, 2018.

1.6.2.2.3. OPA1

Structure d'OPA1 :

Une fois la fusion des membranes mitochondriales externes achevée, les IMM doivent également fusionner pour compléter le processus de fusion mitochondriale et la protéine OPA1 en est l'acteur principal. OPA1 est également une dynamine, codée par le gène nucléaire *OPA1* (locus 3q29, Uniprot O60313). Chez l'homme, OPA1 existe sous huit

isoformes issues de l'épissage alternatif des exons 4, 4b et 5b, codant pour des protéines allant de 924 à 1014 acides aminés. La région N-terminale contient une séquence de ciblage des mitochondries (MTS) qui dirige la protéine vers les mitochondries, suivie d'un domaine transmembranaire (TM) et d'une séquence en spirale. Les trois domaines suivants sont hautement conservés : le domaine GTPase, le domaine intermédiaire et le domaine effecteur GTPase (GED) à l'extrémité C-terminale (**Figure 23**). Les protéines OPA1 sont localisées dans l'espace intermembranaire, les isoformes les plus longues étant ancrées à la membrane mitochondriale interne, en particulier aux jonctions des crêtes. Les huit isoformes sont exprimées de manière ubiquitaire, mais leurs niveaux varient selon les tissus.[117] OPA1 est exprimée principalement dans le cerveau, les muscles, la rétine et les testicules.

Une fois importées dans la mitochondrie via leur séquence MTS, les formes longues d'OPA1, qui sont ancrées à la membrane mitochondriale interne, peuvent être clivées par deux protéases aux sites S1 et S2 pour générer des formes courtes.[118] Chez l'homme, les huit isoformes OPA1-L contiennent un site S1, et la moitié d'entre elles (isoformes 4, 6, 7 et 8) ont également un site S2.[119] YME1L clive le site S2, et OMA1 le site S1[120] (**Figure 23**) et aucun clivage d'OPA1 ne se produit lorsque les cellules sont dépourvues à la fois de YME1L et d'OMA1.[121] Dans des conditions physiologiques, ces deux protéases maintiennent un équilibre entre les formes OPA1-L et OPA1-S.

Contrairement à YME1L, OMA1, qui clive en S1, donc les 8 isoformes, est activé dans des conditions de stress, telles que l'épuisement de l'ATP, la perte du potentiel membranaire, le stress oxydatif ou les stimuli apoptotiques.[122]

Fonction d'OPA1 :

En 2000, le lien est établi entre le gène OPA1 (Optic Atrophy 1) et le syndrome de Kjer, une maladie mitochondriale entraînant une atrophie du nerf optique.[123] Depuis de nombreuses études ont permis de mettre en lumière les rôles d'OPA1 et les conséquences pathologiques de ces mutations, essentiellement des pathologies mitochondriales.[122]

Le rôle principal d'OPA1 est la fusion des IMM mais sa fonction complète est plus complexe, par ses 8 isoformes (**Figure 23**) qui n'ont pas toutes la même fonction. Pour mieux comprendre le rôle de chacune, une inactivation sélective des trois exons alternatifs : 4, 4b et 5b a été effectuée dans les cellules HeLa[124] et a mis en lumière que l'exon 4 d'*OPA1* est impliqué dans la fusion mitochondriale, l'exon 4b participe au maintien de l'ADNmt et l'exon 5b aide probablement à préserver la structure des crêtes.[117,124] Cependant, cette approche expérimentale ne permet pas de déterminer si une seule isoforme OPA1 est spécifiquement liée à une fonction mitochondriale définie.

Pour cela, une analyse moléculaire a été réalisée dans des cellules OPA1$^{-/-}$, où des variantes d'épissage individuelles d'OPA1 étaient exprimées de manière stable (OPA1-L, OPA1-S et OPA1-L + OPA1-S).[125] Cette analyse a suggéré que la forme longue (OPA1-L) est suffisante pour induire la fusion de la membrane interne, tandis que l'expression des seules formes courtes (OPA1-S) inhibe la fusion de la membrane interne et entraîne un phénotype fragmenté. Ainsi, OPA1 peut également jouer un rôle dans la fission mitochondriale, ou plus probablement, dans un défaut de fusion qui conduit à la fission.

Il a également été démontré que l'inactivation d'OPA1 perturbe la distribution des nucléoïdes dans les mitochondries et l'ancrage de l'ADNmt à la membrane mitochondriale interne. OPA1 est donc essentielle au maintien et à la réplication de l'ADNmt.[126]

Mécanisme de la fusion de l'IMM :

L'étude de l'organisation des IMM est un vrai défi dans le milieu de la recherche mitochondriale et cela vaut aussi pour leur fusion. La forme longue d'OPA1 (OPA1-L) servirait de médiateur à deux types d'interactions : 1) entre deux protéines OPA1-L, afin de maintenir la structure des jonctions des crêtes ; 2) entre OPA1-L et les cardiolipines de la membrane interne, afin de favoriser la fusion.[127] Cependant, le mécanisme précis par lequel les membranes internes se réunissent pour fusionner reste partiellement compris à ce jour.

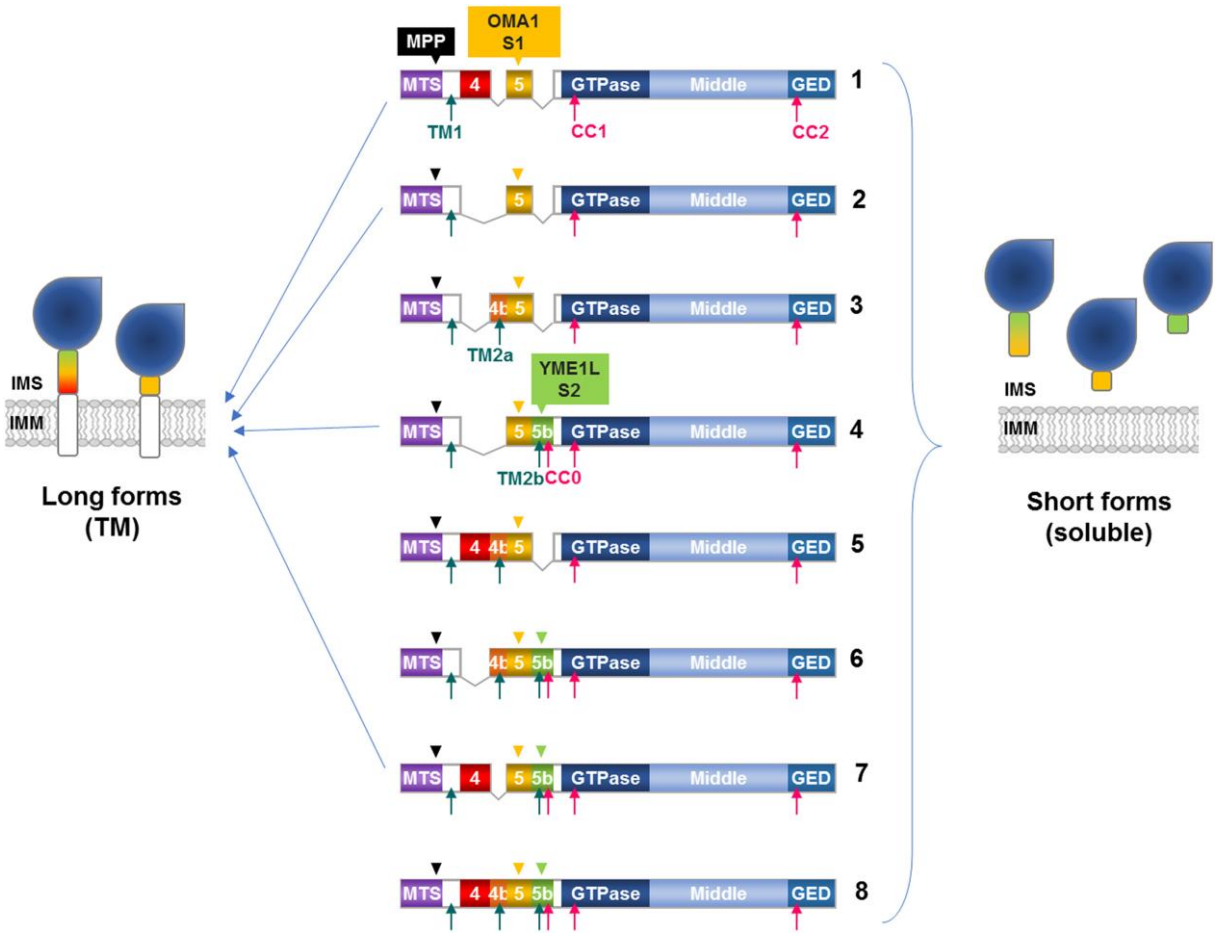


Figure 23 : 8 isoformes de OPA1 chez l'homme

OPA1 est épissée alternativement pour générer huit isoformes. Après importation dans l'IMM, la séquence de ciblage mitochondrial (MTS) est clivée par la peptidase de traitement mitochondrial (MPP) pour générer les formes longues TransMembranaires (TM). Les domaines TM1, TM2a, TM2b et les domaines en spirale (coiled-coil) CC0, CC1, CC2 sont indiqués respectivement par des flèches bleues et rouges. Toutes les isoformes contiennent l'exon 5 avec le site de clivage S1 (pointe de flèche jaune), tandis que la moitié d'entre elles (isoformes 4, 6, 7, 8) contiennent également le site de clivage S2 (pointe de flèche verte). Le clivage protéolytique aux sites de clivage S1 et S2 par les peptidases OMA1 et YME1L génère les formes courtes solubles dans l'IMS. De Del Dotto *et al.*, 2018.

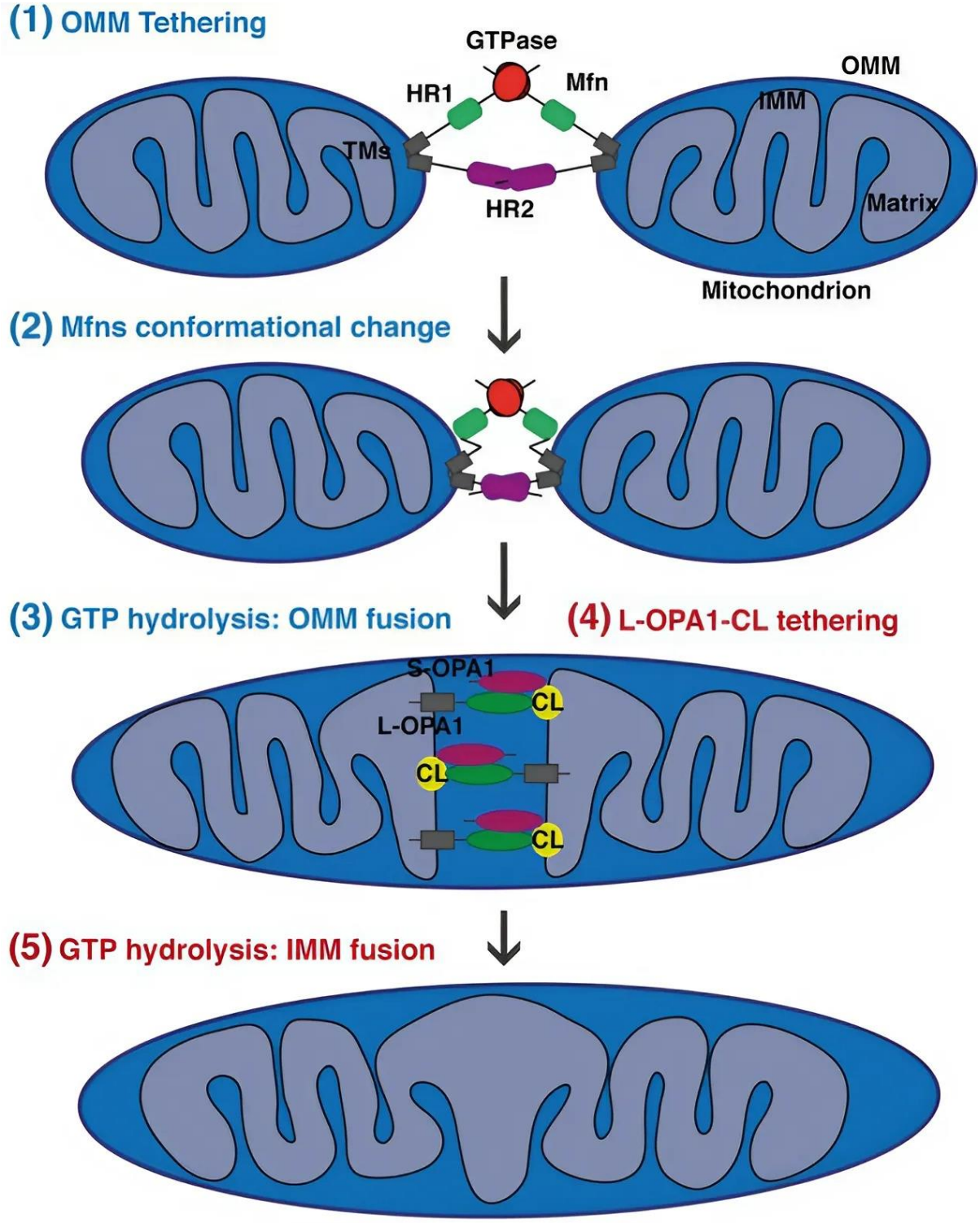


Figure 24 : Modèle de fusion mitochondriale chez les mammifères

1) La membrane externe de deux mitochondries opposées est attachée par l'interaction en trans des domaines HR2 et/ou GTPase des Mitofusines. **2)** La liaison et/ou l'hydrolyse du GTP induisent un changement de conformation des Mitofusines conduisant à l'arrimage mitochondrial et à une augmentation des sites de contact membranaire. **3)** L'action GTPase, l'oligomérisation dépendante du GTP ou une variation en composition phospholipidique assure la fusion de l'OMM. **4)** OPA1 et CL lient les deux IMM. **5)** Les IMM fusionnent grâce à l'hydrolyse du GTP dépendante d'OPA1. Adapté de Tilokani *et al.*, 2018.

1.6.2.3. La fission mitochondriale

1.6.2.3.1. Principe de la fission mitochondriale

La fission mitochondriale est un processus fondamental pour plusieurs mécanismes cellulaires clés, tels que l'élimination des mitochondries par la mitophagie, et la distribution de l'ADNmt. Chez les mammifères, la fission mitochondriale est régulée par plusieurs protéines, dont DRP1 (Dynamin related protein 1), GDAP1, Fis1, MFF, et MID49/51.

1.6.2.3.2. DRP1

DRP1 (Dynamin-Related Protein 1), également nommée DLP1 ou DNML1 (Dynamin-Like protein 1) est une protéine de 736 AA jouant un rôle clé dans la fission mitochondriale. Elle est codée par le gène *DNML1* (locus 12p11.21, Uniprot O00429) et se compose de 4 domaines. Le domaine GTPase permet l'utilisation du GTP pour fournir l'énergie nécessaire à la fission. Le domaine central (Middle) dispose de 3 régions « stack » qui peuvent se replier pour former des interfaces : la 2 est celle par laquelle les dimères se forment, la 1 est dédiée aux polymères et la 3 à la liaison avec l'OMM. La région variable (B-insert) dépend de l'isoforme de DRP1 et un domaine effecteur (GED) régule l'hydrolyse du GTP par le domaine GTPase. Certaines séquences répétées ont été identifiées et permettent de séparer différents domaines : les BSE (Bundle Signaling Elements) (**Figure 25**).[128]

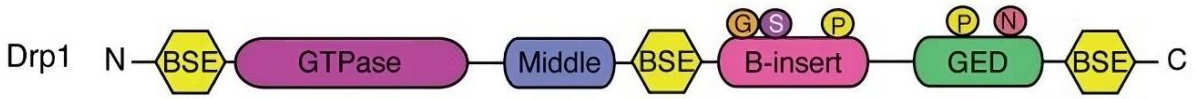


Figure 25 : Domaines structuraux de Drp1

BSE : Bundle Signaling Element, a un rôle de stucturation uniquement. GED: GTPase Effector Domain. P (Phosphorylation), N (S-nitrosylation), S (SUMOylation), G (O-GLcNAcylation). De Tilokani *et al.*, 2018.

DRP1 est finement régulée par un grand nombre de facteurs. Au niveau transcriptionnel, 10 isoformes de DRP1 sont produites par épissage alternatif. Chez l'humain, les modifications sont liées à l'A-insert : 13 AA dans l'exon 3, au niveau du domaine GTPase, et au B-insert : 37 AA dans le domaine variable. Plus l'isoforme présente d'inserts, moins elle a d'impact sur la fission mitochondriale.[129]

Au niveau post-traductionnel, DRP1 subit également de nombreuses modifications pouvant altérer sa fonction (**Tableau 3**).[130]

Tableau 3 : Modifications post-traductionnelles clés de DRP1

De C. Lhuissier, 2022

Modification	Biologic effect	References
Phosphorylation (Ser616) by CDK1/Cyclin B	Promotes fission in mitotic phase cells	Kashatus *et al.*, 2011; Taguchi *et al.*, 2007
Phosphorylation (Ser637) by PKA	Inhibits fission by blocking DRP1's GTPase activity	Chang & Blackstone 2007; Cribbs & Strack, 2007
Phosphorylation (Ser600) by CaMK1α	Activates fission	Chang & Blackstone, 2007
DePhosphorylation by Calcineurin	Activates fission	Cribbs & Strack, 2007
Ubiquitination by MARCH5	Reduces fission by targeting DRP1 for proteasomal degradation	Nakamura *et al.*, 2006; Yonashiro *et al.*, 2006
SUMOylation (Lys532, Lys535, Lys558, Lys568, Lys594, Lys606, Lys608) by MAPL	Positively regulates fission	Wasiak, Zunino, & McBride, 2007
S-Nitrosylation (Cys644)	Enhances DRP1 dimerization and fission	Cho *et al.*, 2009
O-GlcNAcylation (Thr-585 and Thr-586)	Promotes DRP1 relocalization to mitochondria, enhancing fission	Gawlowski *et al.*, 2012

1.6.2.3.3. Les protéines adaptatrices de DRP1

Bien que DRP1 soit principalement cytoplasmique, elle est recrutée aux sites de fission des mitochondries avec l'aide de protéines adaptatrices telles que Fis1, MFF, et MID49/51.

Fis1 est codé par le gène *FIS1* (locus 7q22.1, Uniprot Q9Y3D6). C'est une petite protéine composée de 152 acides aminés, comportant un domaine transmembranaire C-terminal intégré dans l'OMM et un domaine N-terminal faisant face au cytoplasme. Le domaine N-terminal est constitué de six hélices α antiparallèles et contient deux motifs de répétition tétratricopeptidique (TPR), qui joueraient un rôle dans le recrutement de DRP1.[131,132] Il a récemment été démontré qu'elle interagit directement avec DRP1 et que certaines de ses

mutations peuvent induire une élongation ou une fragmentation du réseau mitochondrial, suggérant que cette protéine est en fait un régulateur important de la dynamique mitochondriale.[133]

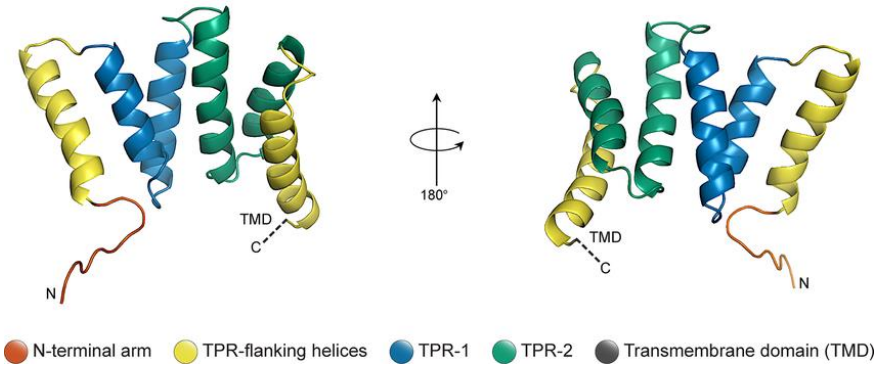


Figure 26 : Structure de FIS1

TPR : TétratricoPeptidique Repeats. De U.K. Ihenacho *et al.*, 2021. [134]

MFF (Mitochondrial Fission Factor) est une protéine de 342 AA codée par le gène *MFF* (locus 2q36.3, Uniprot Q9GZY8). Elle se compose de deux motifs répétés N-terminaux (RR), suivis d'un domaine en spirale (CC) et d'un domaine transmembranaire C-terminal (**Figure 27**).[135] MFF existe sous huit isoformes, dont l'expression dépend de la présence ou de l'absence de l'exon 1. MFF est l'un des récepteurs de DRP1 sur l'OMM et son inactivation par interférence d'ARN (ARNi) entraîne l'élongation mitochondriale.[135] À l'inverse, la surexpression de MFF induit une fragmentation du réseau mitochondrial, accompagnée d'un recrutement accru de DRP1 dans les mitochondries.[135]

MID49 (MItochondrial Dynamic protein 49), également connue sous le nom de MIEF2 (MItochondrial Elongation Factor 2), est une protéine composée de 454 AA codée par le gène *MIEF2* (locus 17p11.2, Uniprot Q96C03). Elle contient un domaine transmembranaire N-terminal et un domaine nucléotidyltransférase. **MID51**, également connu sous le nom de MIEF1, est codé par le gène *MIEF1* (locus 22q13.1, Uniprot Q9NQG6) et se compose de 463 AA. Les deux protéines partagent 45 % d'homologie et présentent les mêmes domaines (**Figure 27**).[136]

MID49 et MID51 sont ancrées à l'OMM via leurs NTD, leurs CTD s'étendant dans le cytoplasme. MID49 et MID51 ont l'ADP comme cofacteur, favorisent ensemble l'oligomérisation de DRP1 et contrôlent son activité GTPase. MID49/51 recruterait en fait la protéine DRP1 liée au GTP pour faciliter son oligomérisation et son activité tandis que MFF recruterait les oligomères de DRP1 sur l'OMM.[137,138]

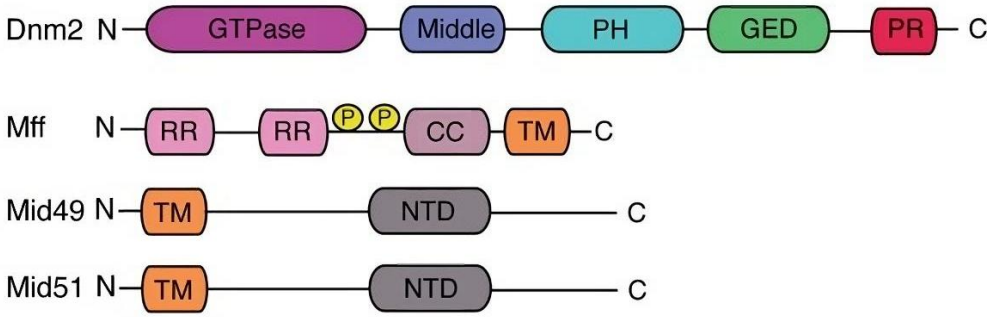


Figure 27 : Structure de protéines impliquées dans la fission mitochondriale

De Tilokani *et al.*, 2018

1.6.2.3.4. Le mécanisme de la fission mitochondriale

Ensemble, ces informations ont permis, en 2018, de mettre en place un modèle complexe de fission mitochondriale (**Figure 28**).[122] Il n'est pas encore complet et il reste beaucoup à découvrir, notamment sur les partenaires protéiques de DRP1.

Tout débute avec une première constriction des mitochondries par l'annelage du RE autour de celles-ci, qui serait un mécanisme dépendant du Ca^{2+}.[139] La création de points de contacts mitochondrie-RE, co-localisée avec les sites de réplication de l'ADNmt[140], serait induite par l'association de INF2 (INverted-Formin 2), liée au RE avec Spire1C, elle-même ancrée à l'OMM.[141] Ces protéines induisant la nucléation de l'actine et la polymérisation de la F-actine conduisant ainsi à la pré-constriction de la mitochondrie sous l'action conjointe du RE, de l'actine et de la myosine II.[142]

Ensuite MFF et Mid49/51 recruteraient DRP1 sur le site de contact qui s'oligomérise pour créer un anneau de constriction. Cette constriction est effectuée grâce à l'activité GTPase de DRP1 mais elle n'est pas forcément suffisante pour sectionner les deux mitochondries qui vont résulter de ce processus. Ce rôle est plutôt attribué à Dnm2 (Dynamine 2), qui intervient tardivement pour s'organiser sous forme d'anneau elle aussi.[143] Enfin, toute la machinerie se désassemble des mitochondries « filles » résultant de la fission de la mitochondrie « mère ». Ce processus est indispensable pour le transport des mitochondries et l'élimination de fragments défectueux par autophagie sélective, ou « mitophagie ».

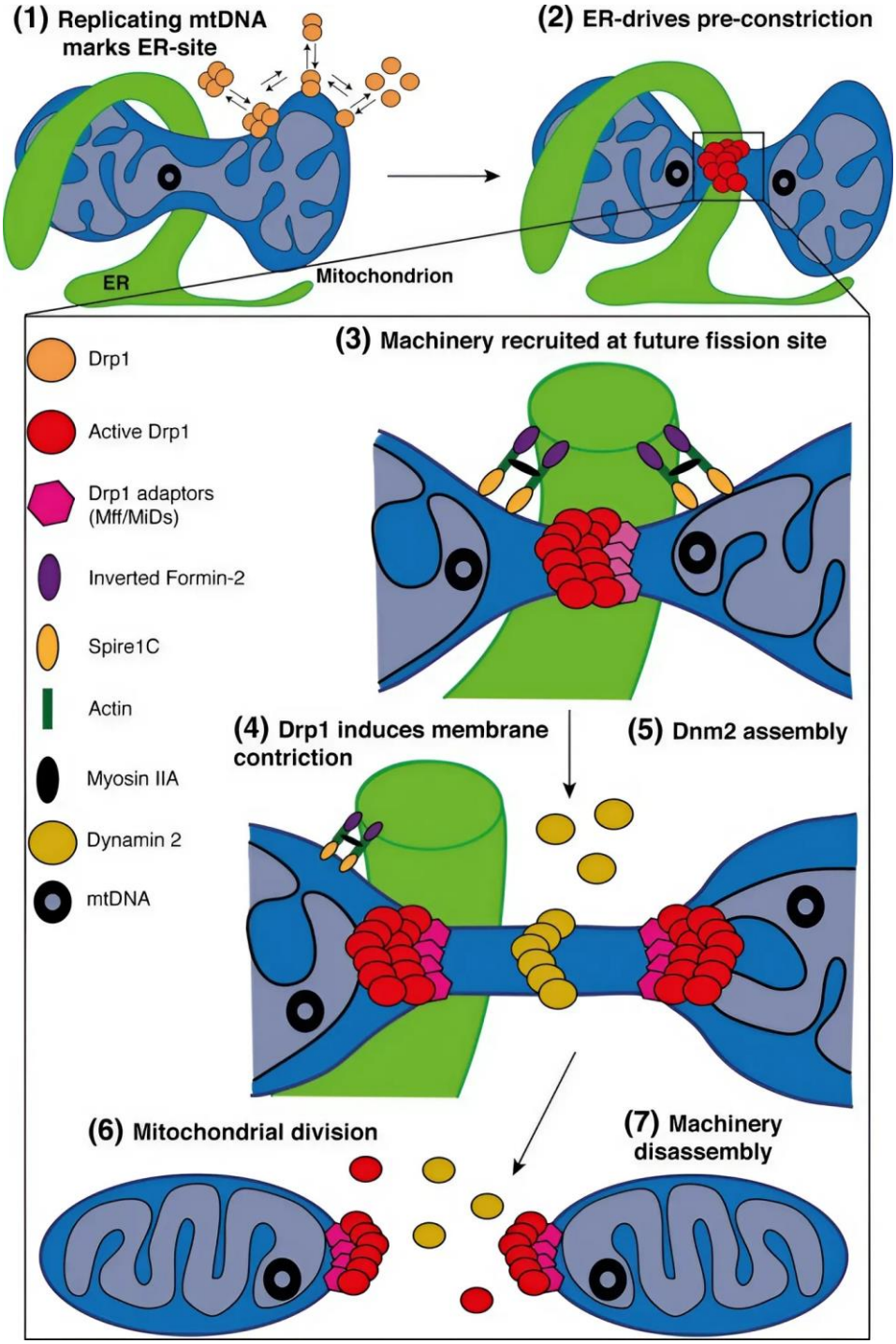


Figure 28 : Modèle de fission mitochondriale chez les mammifères

1) Dans la matrice, les sites de réplication de l'ADNmt marquent les points de recrutement du RE. Les sites de contact mitochondries-RE induisent l'oligomérisation et la maturation de DRP1. **2)** Les formes oligomériques de DRP1 s'accumulent aux sites de contact où la pré-constriction de la membrane a été initiée. **3)** L'INF2 liée au RE et le Spire1C mitochondrial induisent la nucléation et la polymérisation de l'actine aux sites de contact mitochondries-RE. La myosine IIa peut assurer la contraction du câble d'actine, fournissant la force mécanique nécessaire à la pré-constriction des mitochondries. Sur ces sites, MFF et les MiDs recrutent DRP1 qui s'oligomérise dans une structure en anneau et **4)** l'hydrolyse du GTP conduit à un changement de conformation, améliorant la constriction mitochondriale préexistante. **5)** DNM2 est recrutée au col de constriction où elle s'assemble et termine la scission membranaire, **6)** conduisant à deux mitochondries « filles ». **7)** La machinerie de fission est ensuite désassemblée. De Tilokani *et al.*, 2018.

1.6.2.4. Pathologies associées

Des mutations pathogènes dans les gènes codant pour les composants de la machinerie de fission et de fusion mitochondriale ont été associées à différentes pathologies humaines graves, soulignant le rôle physiologique de la dynamique mitochondriale dans l'homéostasie cellulaire (**Tableau 4**). Ces défauts de la dynamique mitochondriale sont principalement associés à des syndromes cliniques neuromusculaires ou du système nerveux central (SNC), qui ont une évolution clinique progressive et sont responsables de handicaps graves.[122]

Des études de génétique clinique ont identifié des mutations pathogènes dans *MFN2*, *GDAP1*, *INF2* et *DNM2* comme cause de différents types de maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT), un groupe de neuropathies périphériques héréditaires caractérisées par une dégénérescence des axones sensoriels et moteurs périphériques, une perte sensitive distale, une atrophie musculaire et une faiblesse générale. Les mutations du gène *DNM2* ont également été responsables de la myopathie centronucléaire ou du syndrome de contracture congénitale létale 5.[122]

Des mutations dominantes ont été rapportées dans *OPA1* et associées à l'atrophie optique dominante (AOD), la neuropathie optique héréditaire la plus courante. Cette neuropathie est caractérisée par une perte de cellules ganglionnaires rétiniennes dans le nerf optique, entraînant une perte graduelle et progressive de la vision. Un sous-ensemble de mutations dominantes dans le domaine GTPase de OPA1, directement impliqué dans la fusion IMM, a été associé à un syndrome d'atrophie optique dominante (AOD) « plus », défini par le développement de symptômes supplémentaires tels que la surdité, l'ataxie et la myopathie tout au long de l'âge adulte. De plus, des mutations récessives dans *OPA1* peuvent provoquer le syndrome de Behr, un trouble neurologique complexe caractérisé par une atrophie optique d'apparition précoce, une ataxie, une spasticité et un retard mental. Ces trois syndromes cliniques distincts dus aux mutations d'*OPA1* ne sont pas clairement expliqués par la physiopathologie sous-jacente.

Les mutations de *DRP1* conduisent à un syndrome neurologique sévère avec microcéphalie, développement cérébral anormal, atrophie optique et acidémie lactique persistante.

Les patients porteurs de mutations dans *MFF* présentent des crises d'épilepsie, une neuropathie optique et une microcéphalie. Les patients porteurs de mutations dans *MIEF2* souffrent de myopathie avec déficit d'activité du CI et du CIV dans les muscles.

Tableau 4 : Syndromes cliniques dus à des mutations dans les gènes codant les composants des machines de fission et de fusion

De Tilokani *et al.*, 2018

Gene	OMIM	Inheritance	Disease	Symptoms	Refs
MFN2	608507	AD	Charcot–Marie–Tooth disease type 2A (CMT2A)	Distal limb muscle weakness and atrophy, axonal degeneration/regeneration, areflexia, distal sensory loss. With or without: cognitive decline, spasticity, encephalopathy (CNS), optic atrophy, hearing loss and vocal cord paresis	S. Zuchner *et al.*, 2004
		AR	CMT2A		K. Kijima *et al.*, 2005
		AD	Hereditary neuropathy VIA		I. Voo *et al.*, 2003
OPA1	605290	AD	Optic atrophy 1	Progressive loss of visual acuity, temporal optic nerve pallor, central scotoma. With or without CNS and axonal sensorineural polyneuropathy	C. Delettre *et al.*, 2000
		AD	Optic atrophy plus syndrome		C. Alexander *et al.*, 2000
		AR	Behr syndrome	Early-onset optic atrophy accompanied by neurologic features, including ataxia, pyramidal signs, spasticity and mental retardation	P. Yu-Wai-Man *et al.*, 2010
DNM1L	603850	AR/AD	Encephalopathy	Abnormal brain development, seizures, hepatic dysfunction, encephalopathy, dysmorphism	G. Yoon *et al.*, 2016
		AD	Optic atrophy 5	Progressive loss of visual acuity, optic nerve atrophy and central scotoma	J.R. Vanstone *et al.*, 2016
MFF	614785	AR	Encephalopathy	Seizures, dysphagia, optic and peripheral neuropathy, developmental delay, microcephaly, cerebellar atrophy and basal ganglia lesions	J. Koch *et al.*, 2016
MIEF2	615498	AR	Mitochondrial myopathy	Progressive muscle weakness, muscle pain and exercise intolerance	M. Bartsakoulia *et al.*, 2018
DNM2	602378	AD	Centronuclear myopathy 1	Slowly progressive muscle weakness	S. Zuchner *et al.*, 2005
		AD	CMT2M	Distal limb muscle weakness and atrophy and sensory impairment, areflexia +/− neutropenia	
		AR	Lethal congenital contracture syndrome 5	Polyhydramnios, decreased fetal movements, intracranial bleeding, retinal haemorrhage, joint contractures and respiratory insufficiency	
GDAP1	606598	AR	CMT4A	Distal limb muscle weakness and atrophy and sensory impairment, areflexia. With or without axonal regeneration and vocal cord paresis	R.V. Baxter *et al.*, 2002 ; A. Cuesta *et al.*, 2002
		AR/AD	CMT24		
		AD	CMTA		
		AR	CMT, vocal cord paresis		

Les études sur des modèles *in vivo* et *in vitro* avec altérations des acteurs de la fission/fusion mitochondriale ont été fondamentales pour mettre en lumière le rôle crucial de la dynamique mitochondriale dans le contrôle des décisions relatives au destin cellulaire. Cependant, la complexité clinique et génétique de ces troubles n'a pas encore été expliquée et des études supplémentaires sont nécessaires pour améliorer notre compréhension des bases moléculaires des maladies associées aux dysfonctions de la dynamique mitochondriale.[122]

1.6.3. Mitophagie

1.6.3.1. Autophagie

1.6.3.1.1. Contexte

La mitophagie étant une forme d'autophagie dédiée à la mitochondrie, il convient donc de définir cette autophagie en premier lieu.

Le terme « autophagie », dérivé du grec signifiant « se manger soi-même », a été inventé par Christian de Duve il y a plus de 50 ans et s'appuyait en grande partie sur la dégradation des mitochondries et d'autres structures intracellulaires observée dans les lysosomes de foie de rat perfusés avec du glucagon[144] (une hormone pancréatique antagoniste à l'insuline dans le sens où elle induit la libération de sucres à partir du glycogène). Il est remarquable que ce mécanisme d'autophagie induite par le glucagon ne soit toujours pas encore entièrement compris au niveau moléculaire, si ce n'est qu'il nécessite l'activation de la protéine kinase-A induite par l'AMP cyclique et qu'il est hautement spécifique au foie.[145] Depuis une vingtaine d'années, le monde scientifique a «redécouvert» l'autophagie, avec de nombreuses contributions à la compréhension des mécanismes moléculaires impliqués et de son importance physiologique. En particulier, la simplicité biologique et de culture du modèle levure (Saccharomyces cerevisiae) a permis de nombreuses découvertes sur la régulation et l'exécution de ce mécanisme.[146,147] Actuellement, 32 gènes liés à l'autophagie (Atg) ont été identifiés par criblage génétique chez la levure et bon nombre de ces gènes sont conservés dans les plantes, les vers, les mouches et les mammifères, soulignant l'importance du processus autophagique à travers la phylogénie.[146]

L'autophagie est un processus de dégradation cellulaire qui maintient l'homéostasie en éliminant les organites endommagés et les protéines mal repliées. Elle existe sous trois

formes principales : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par protéines chaperonnes (**Figure 29**).

1.6.3.1.2. La macroautophagie

La macroautophagie implique la formation d'autophagosomes, des vésicules à double-membrane phospholipidique, qui séquestrent le contenu cytoplasmique (qu'il s'agisse de macromolécules, d'organites entiers, fragmentés ou détruits) et le livrent aux lysosomes, où il sera dégradé grâce aux hydrolases acides lysosomales. Ce processus est régulé par des acteurs clés tels que le complexe ULK1 et les protéines ATG, en réponse à une carence en nutriments ou à un stress cellulaire. La mitophagie est généralement une macroautophagie spécialisée, même si l'un des 3 types de mitophagie identifiés n'en fait pas partie.[148]

1.6.3.1.3. La microautophagie

La microautophagie, implique l'invagination directe de la membrane lysosomale pour engloutir le matériel cytoplasmique. Ce processus dépend moins des protéines ATG et repose plutôt sur la dynamique membranaire régulée par les protéines ESCRT.[149]

1.6.3.1.4. L'autophagie médiée par protéines chaperonnes (CMA)

Enfin, la CMA est un processus hautement sélectif dans lequel les protéines cytosoliques contenant un motif KFERQ sont reconnues par la chaperone HSC70 et transportées vers la membrane lysosomale, où elles se lient au récepteur LAMP2A. LAMP2A facilite ensuite la translocation des protéines substrats dans la lumière lysosomale pour dégradation.[150]

Les défauts d'autophagie liés à des mutations des acteurs précédemment cités sont associés à un nombre très important de pathologies cardiaques, musculaires, oculaires, neurodégénératives, métaboliques, cancérigènes, immunitaires, rénales ou pulmonaires. Ceci souligne l'aspect ubiquitaire et vital de ce mécanisme de recyclage intracellulaire.[151]

Ensemble, ces voies maintiennent le contrôle de la qualité cellulaire en éliminant les organites endommagés comme les protéines mal repliées et les mitochondries.

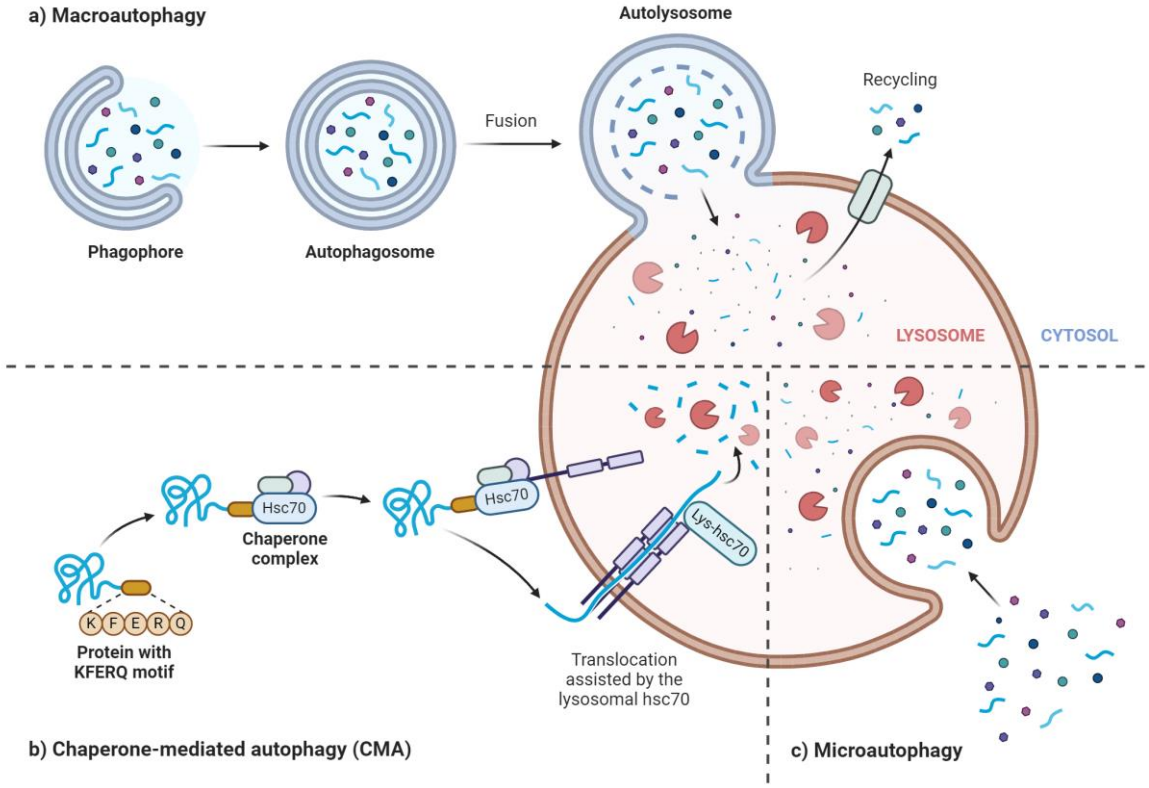


Figure 29 : Les trois types d'autophagie

1.6.3.1.5 Le mécanisme de macroautophagie (et mitophagie classique)

Initiation :

L'initiation de la macroautophagie diffère de l'initiation de la macromitophagie, disposant également de sa propre signalétique de recrutement du phagophore.

Le premier acteur de ce processus de recyclage intracellulaire est le complexe protéique ULK (**Figure 30**). Ce complexe est composé de ULK1 (Unc-51-Like autophagy activating Kinase 1, protéine homologue de la levure Atg1), ATG13, RB1CC1 (RB1 [RétinoBlastome 1] inducible Coiled-Voil 1 ou FIP200) et ATG101. Ensemble, ces protéines forment une plateforme d'interaction avec les transducteurs des signaux d'autophagie et initient la formation de l'autophagosome lorsqu'ils sont activés.[152] Ils recrutent ainsi les premiers lipides avec lesquels ils vont former le PAS (Phagophore Assembly Site).[153] Ces lipides peuvent provenir du RE, d'endosomes, de mitochondries, de la membrane plasmique, ou de l'appareil de Golgi.[154]

Parmi ces transducteurs se trouve L'AMPK (Kinase activée par l'AMP), un régulateur essentiel qui agit en amont en phosphorylant directement ULK1 pour activer l'autophagie.[155]

A l'inverse, mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) est le régulateur négatif de l'autophagie le plus étudié. mTOR est généralement activée par PI3K-Akt et inhibe directement ULK1 pour inhiber l'autophagie.[156] La voie PI3K/Akt/mTOR est hautement régulée puisqu'elle induit la croissance et la survie des cellules, ce qui fait qu'elle est également très étudiée pour son rôle dans la carcinogénèse[156], ainsi que dans l'apparition, le maintien et l'échappement de la sénescence cellulaire.[157–159] Ainsi, tous les stimuli jouant sur la croissance (concentration en nutriments, Ca^{2+}, agents inflammatoires ou encore hormones de croissance et autres signaux) jouent sur cette voie ou directement sur le complexe ULK pour stimuler ou réprimer la mise en marche de l'autophagie, mais aussi d'autres voies de signalisation.

Nucléation du phagophore :

Le second complexe protéique mis en jeu est PI3K (Phosphoinositide 3-Kinase). Il est composé de Beclin-1, VPS34 (Vacuolar Protein Sorting 34, ou PIK3C3), VPS15 (PIK3R4), ATG14, Ambra1 (Activating molecule in beclin1-regulated autophagy[160]) et UVRAG (UV Resitance Associated gene). Ce complexe est responsable de la nucléation du phagophore. Beclin1 est généralement phosphorylée par ULK1 et agit comme un échafaudage pour le complexe PI3K, recrutant des protéines liées à l'autophagie, telles que ATG9, pour se localiser dans le phagophore et permettre sa structuration autour de la zone à capturer.[161]

Maturation et élongation du phagophore :

L'élongation du phagophore repose sur plusieurs systèmes de conjugaison liée à l'ubiquitine. Tout d'abord, l'ubiquitine ligase E1 ATG7 et l'ubiquitine ligase E2 ATG10 conjuguent ATG12 à ATG5. Ensuite, ATG12-ATG5 se lie à ATG16L1 et le complexe résultant se joint à la membrane du phagosome pour préparer le recrutement de la protéine associée à LC3B (microtubule-associated protein 1, Light Chain 3 Beta).[162] Après le clivage de LC3 par ATG4 pour former LC3B-I, ATG7, ATG3 et le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 génèrent LC3B-II.[163] LC3B-II est alors capable de rejoindre la membrane du phagosome et de faciliter l'extension et la fermeture du phagophore grâce à sa lipidation pour former un autophagosome mature.

Dégradation et recyclage par l'autolysosome :

Une fois l'autophagosome mature formé, il fusionne soit avec un lysosome, devenant un autophagolysosome, soit avec un endosome, formant un intermédiaire appelé amphisome, avant de fusionner avec le lysosome. RAB7A, une petite GTPase essentielle et la protéine membranaire associée au lysosome 1 (LAMP1) favorisent la formation autophagolysosome. Lors de la fusion, le lysosome utilise une adénosine triphosphatase vacuolaire pour acidifier le compartiment de ce qui devient l'autolysosome et activer les

hydrolases lysosomales qui digèrent les substrats autophagiques (**Figure 30**). Les métabolites générés à partir de la cargaison digérée sont alors disponibles pour être réutilisés dans la cellule et peuvent être libérés pour influencer les voies de signalisation intracellulaires.[164]

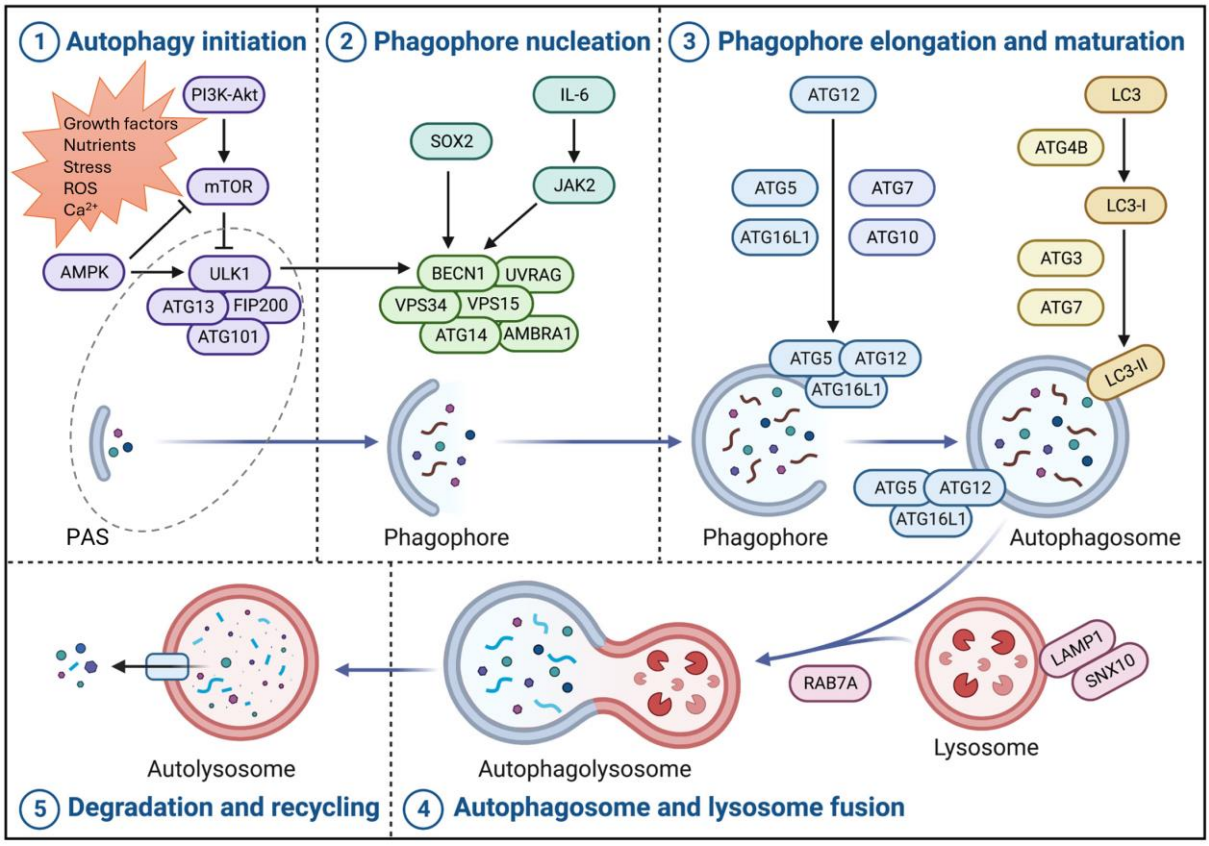


Figure 30 : Les étapes de la macroautophagie / mitophagie classique

PAS : Phagosome Assembly Site. Adapté de Qiang *et al.*, 2022.[165]

1.6.3.2. Les trois types de mitophagie

1.6.3.2.1. Type 1 & 2 (macromitophagies)

Comme précisé précédemment, la mitophagie se différencie essentiellement de l'autophagie par son initiation. En effet, la séquestration des mitochondries dans les autophagosomes se produit par différents mécanismes cellulaires, qui peuvent être appelés mitophagie de type 1 et de type 2 (**Figure 31**). La mitophagie induite par la privation de nutriments est typiquement de type 1, lors de laquelle les PAS s'élargissent pour entourer et séquestrer les mitochondries individuelles dans les mitophagosomes, souvent en coordination avec la fission mitochondriale. La machinerie moléculaire mise

en place est alors similaire à celle de l'autophagie. La mitophagie de type 2 est usuellement liée à un stress aigu de la mitochondrie. Il a été montré que lors d'une photodégradation du contenu mitochodnrial, LC3 vient orner les surfaces des mitochondries individuelles dépolarisées. En premier lieu, de petits agrégats de LC3 se forment puis ils coalescent et fusionnent ensuite en anneaux complets séparant chaque mitochondrie endommagée en un mitophagosome. Contrairement à la mitophagie de type 1, les phagophores en forme de coupe ne se forment pas pendant la mitophagie de type 2 et la fission mitochondriale n'est pas évidente.[166] Néanmoins, après leur formation par un mécanisme de type 1 ou de type 2, les mitophagosomes s'acidifient et leur contenu se dégrade après avoir fusionné avec les lysosomes, grâce notamment aux hydrolases acides que les lysosomes contiennent. Une distinction biochimique majeure entre la mitophagie de type 1 et de type 2 est que l'inhibition de PI3K par la 3-méthyladénine ou la Wortmannine bloque la séquestration mitophagique de type 1 mais pas de type 2, ce qui implique que la mitophagie de type 2 est indépendante de BECLIN-1.[166]

1.6.3.2.2. Mitophagie de type 3 (micromitophagie)

Un autre mécanisme d'élimination ciblée des composants mitochondriaux endommagés est la formation de vésicules dérivées des mitochondries (MDV) qui bourgeonnent puis transitent vers les lysosomes[167,168], c'est la mitophagie de type 3 ou micromitophagie (**Figure 31**). Les MDV sont des vésicules sélectives de chargement libérées par les mitochondries indépendamment du mécanisme de fission mitochondriale. Le stress oxydant stimule la formation de MDV, qui sont enrichies en protéines mitochondriales oxydées.[168] Contrairement à la mitophagie de type 2, la formation de MDV ne nécessite pas de dépolarisation mitochondriale. Bien que la formation et le transit des MDV vers les lysosomes se produisent indépendamment des protéines autophagiques ATG5 et LC3, cette forme d'auto-alimentation des mitochondries nécessite la kinase-1 putative induite par PTEN (PINK1) et Parkin, des protéines impliquées dans la voie la plus décrite de mitophagie[169]. Les MDV finissent par se transformer en vésicules dans des corps multivésiculaires, une forme d'endosome tardif, comme le montre l'immuno-coloration du transporteur de la membrane externe-20 (TOM20).[167] Ensuite, les corps multivésiculaires fusionnent avec les lysosomes pour achever la dégradation hydrolytique des MDV.

Il a récemment été mis en évidence que le recrutement de ATAD3-SAMM50 au niveau de l'IMM permettait d'empaqueter des nucléoïdes endommagés dans des endosomes $VPS35^{+}$, dans les muscles de souris K320E-$Twinkle^{skm}$.[170]

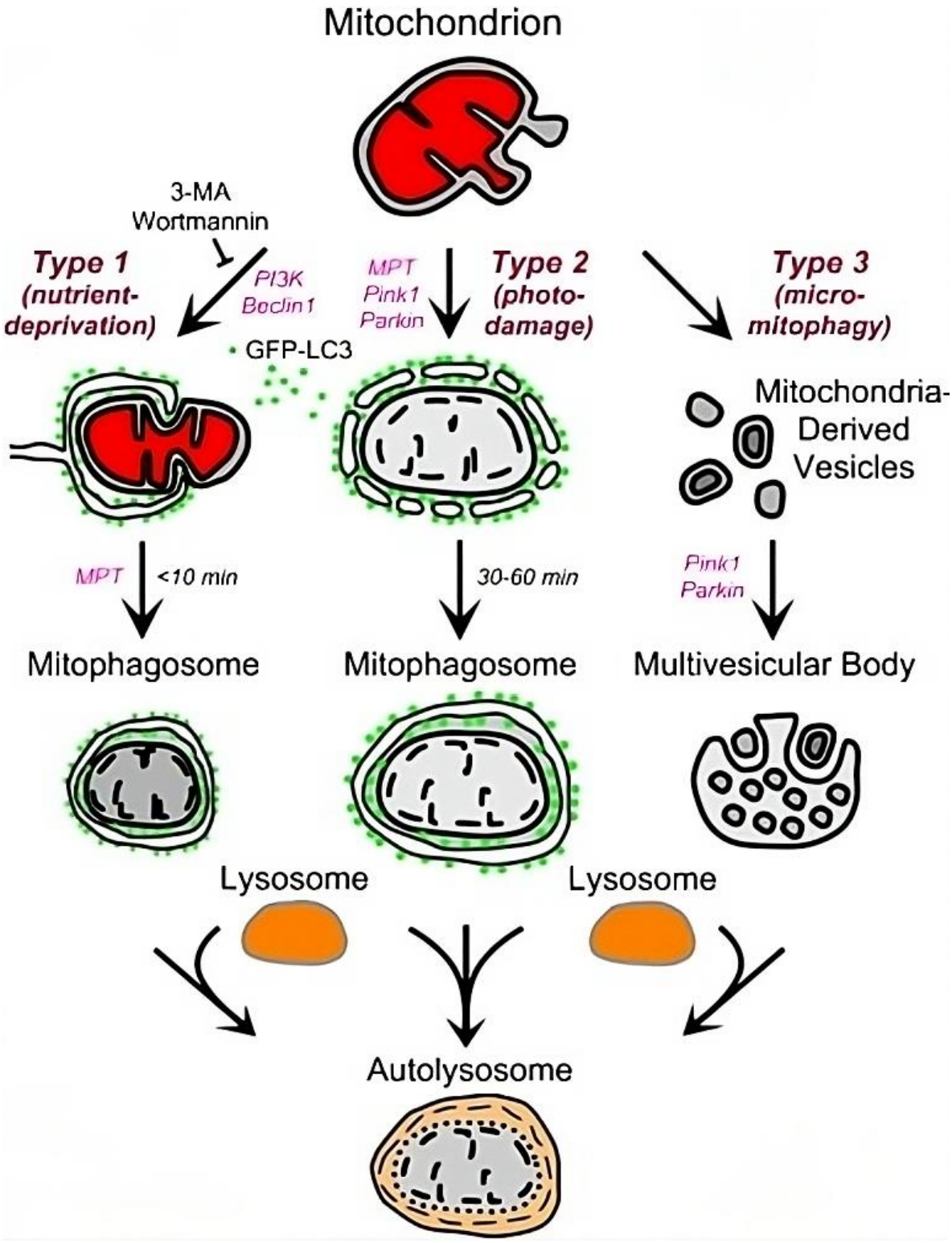


Figure 31 : Les 3 types de mitophagie

De Lemasters *et al.*, 2014

Lors du stress de réplication de l'ADNmt, RAB10 améliore la fragmentation mitochondriale et se déplace du RE vers les lysosomes contenant de l'ADNmt, suggérant que les MDV soient des endosomes identifiables via le marquage de RAB10.[171] Il est intéressant de noter que de telles vésicules se retrouvent dans le sang mais que leur teneur en ADNmt diminue avec l'âge.[172]

1.6.3.3. La mitophagie Parkin-dépendante

1.6.3.3.1. Principe

En 2008, Youle et ses collaborateurs ont montré que la protéine Parkin était recrutée pour dépolariser les mitochondries afin de favoriser la dégradation autophagique des mitochondries.[173] Cette étude est considérée comme une étape importante dans la compréhension de la mitophagie. Depuis lors, la recherche n'a cessé d'explorer ce domaine et de nombreuses voies de mitophagie ont été découvertes.

La kinase putative 1 induite par la sérine/thréonine PTEN (PINK1) est une kinase codée par le gène *PARK6*, et Parkin est une ubiquitine ligase E3 codée par le gène *PARK2*.[174] Les mutations de PINK1 et de Parkin sont les premières décrites comme associées à la maladie de Parkinson autosomique récessive à survenue précoce.[174,175] Des études sur la drosophile ont montré que Parkin agit comme un composant en aval de PINK1 dans la signalisation de la mitophagie.[176,177] Depuis lors, de nombreuses études se sont concentrées sur la façon dont PINK1 régule directement Parkin. Il est essentiel pour cette voie de mitophagie régulée par PINK1-Parkin que les chaînes d'ubiquitine soient assemblées sur les mitochondries. Cet assemblage contient trois composants cruciaux, PINK1 comme capteur de dommages mitochondriaux, Parkin comme amplificateur de signal et les chaînes d'ubiquitine comme effecteur de signal. Ensemble, ils déterminent comment les mitochondries endommagées activent la mitophagie.[178]

1.6.3.3.2. PINK1 : capteur de dommages mitochondriaux

PINK1 comprend une séquence de ciblage mitochondrial N-terminal (MTS). Sous l'aide de TOM22 (translocases de la membrane mitochondriale externe) et TOM70, TOM20 identifie la séquence MTS et dirige PINK1 dans le pore de translocation formé par TOM40, qui cible PINK1 vers le complexe TIM23 dans l'IMM.[176,179] Après cela, PINK1 est séquentiellement clivée par la MPP (Mitochondrial Processing Peptidases) et PARL (Presenilin Associated, Rhomboid-like), puis dégradée par la voie « N-end rule ». Lorsque les mitochondries sont endommagées (dépolarisation membranaire par exemple), le

complexe translocateur de nucléotides à adénine (ANT) inhibe la translocation de PINK1 vers TIM23 en interagissant avec TIM44, un régulateur bien connu de l'importation du polypeptide TIM23.[180] Parallèlement, TOM7 stabilise PINK1 sur l'OMM.[181] Avec l'aide du complexe TOM, PINK1 subit une trans-autophosphorylation (Ser228 dans la protéine humaine), qui déclenche un changement de conformation dans le lobe N et déstabilise ensuite le dimère PINK1, initie la mitophagie en recrutant les facteurs associés au PAS, p62 et LC3B (**Figure 32 A**).

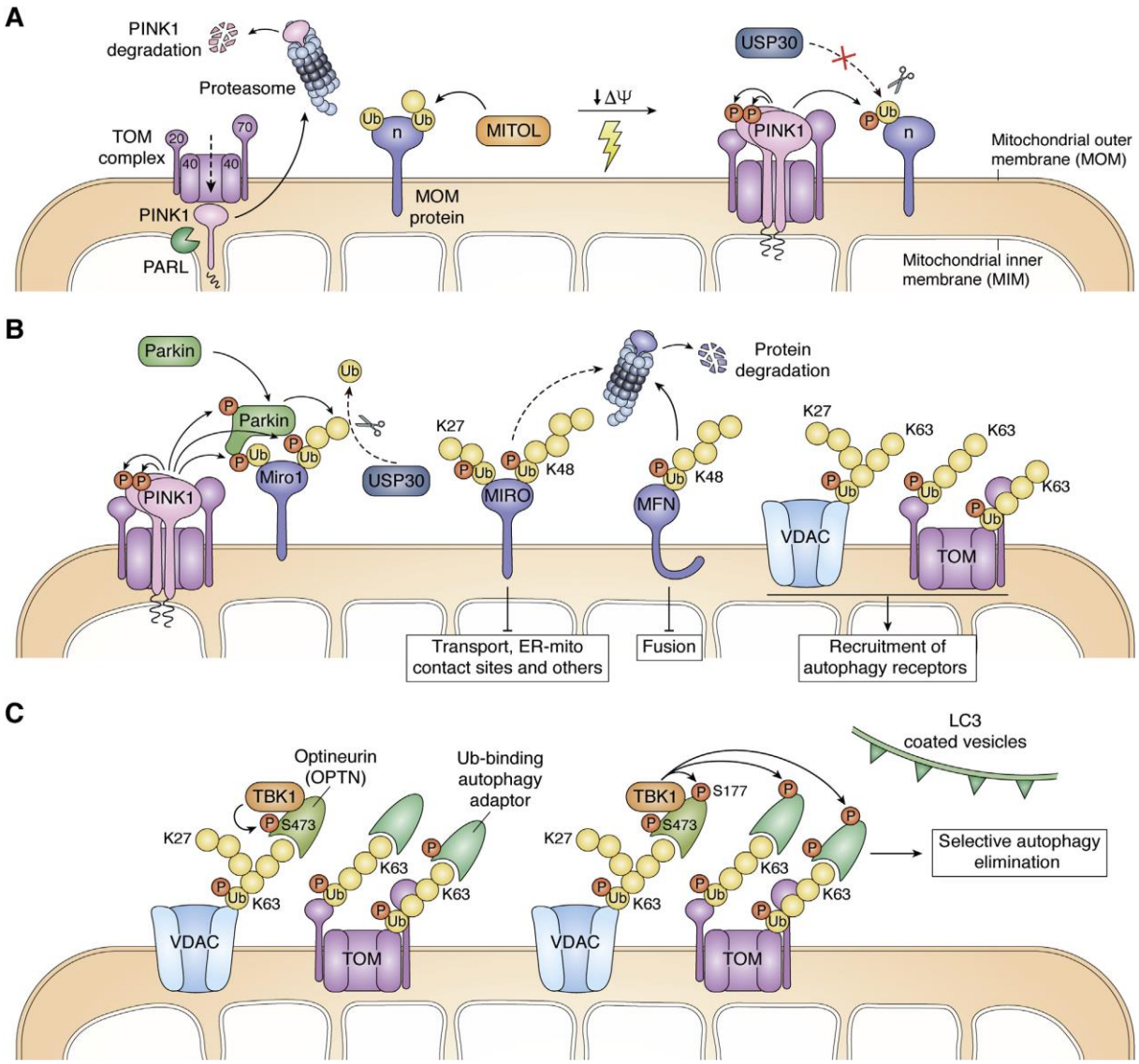


Figure 32 : Représentation schématique de la mitophagie Parkin-dépendante

A) A gauche : dégradation normale de PINK1 par le protéasome après passage par le complexe TOM dans une membrane mitochondriale polarisée. A droite la membrane est dépolarisée, PINK1 devient transmembranaire et s'autophosphoryle pour créer un complexe pouvant ubiquitiner les protéines membranaires voisines. **B)** Les complexes de PINK1 phosphorylent PARKIN qui amplifie l'ubiquitination des protéines membranaires telles que Miro, MFN1, MFN2, VDAC ou même le complexe TOM. **C)** La mitophagie est initiée et les adaptateurs au phagosome, tels que p62, LC3B, l'optineurine ou la TBK1 sont recrutés par les chaines d'ubiquitine. De Terradas *et al*., 2021.[182]

1.6.3.3.3. Parkin : amplificateur de signal

Parkin est constituée de domaines de type ubiquitine (Ubl), répresseur de Parkin (REP), intermédiaire RING (IBR), RING0, RING1 et RING2 (**Figure 33**).[183] Dans les mitochondries saines, Parkin est distribuée de manière diffuse dans le cytosol sous une forme auto-inhibée. Lors de l'interaction avec l'ubiquitine phosphorylée, Parkin subit un remodelage structurel intramoléculaire pour libérer Ubl, qui est facilement phosphorylé par PINK1 à la position Ser65, ce qui entraîne la libération de RING2 et l'exposition de la surface d'interaction E2 dans RING1. RING2 reçoit ensuite l'ubiquitine de E2 via une liaison thioester et la transfère ensuite aux substrats. Grâce à cette cascade de remodelage structurel, Parkin se transforme d'une enzyme dormante auto-inhibante en une E3 active pour ubiquitiner un certain nombre de protéines OMM, telles que MFN1, MFN2, Miro1 et VDAC1 (Canal Anionique Voltage-Dépendant 1).[184–186] Ces protéines ubiquitinées sont en outre phosphorylées par PINK1 pour recruter plus de Parkin dans les mitochondries, générant ainsi plus d'ubiquitine, et ainsi de suite, amplifiant la signalisation pro-mitophagie par PINK1 (**Figure 32 B**).

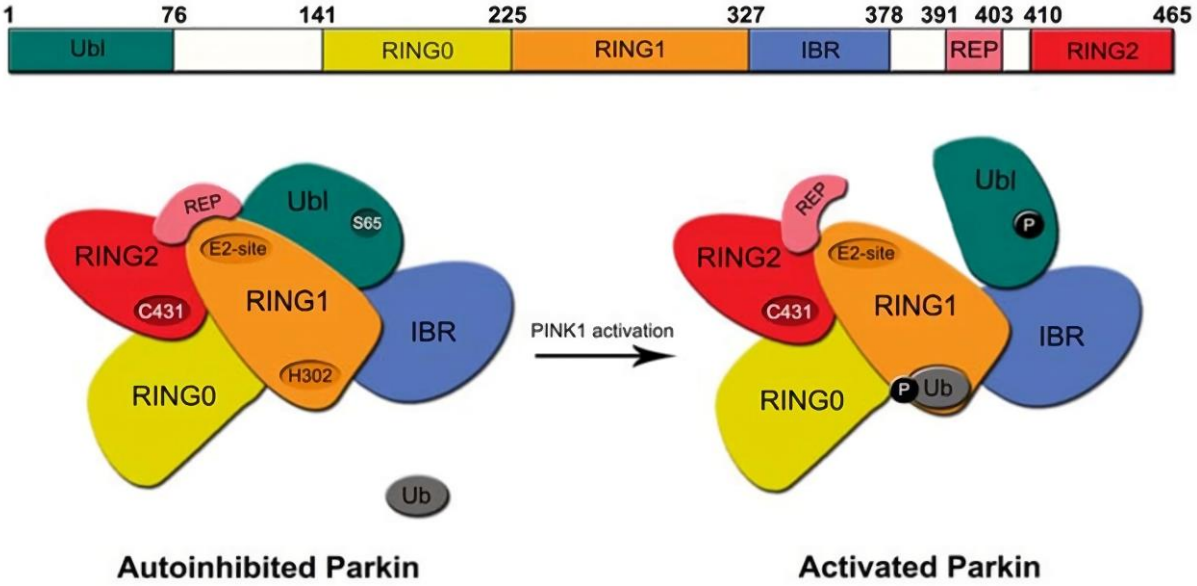


Figure 33 Domaines, organisation et activation de Parkin

De Zhang *et al.*, 2016

1.6.3.3.4. Les chaines d'ubiquitine : effectrices du signal

Les autophagosomes encapsulent les mitochondries marquées à l'ubiquitine pour la dégradation lysosomale. Cependant, les chaines d'ubiquitine elles-mêmes ne se lient pas

à la membrane autophagique isolée ni aux protéines de la famille ATG8 conjuguées à la membrane isolée. Ainsi, les cargaisons ubiquitinées doivent être attachées à la membrane autophagique via certains mécanismes moléculaires. Les adaptateurs d'autophagie sont définis comme des protéines possédant à la fois un domaine de liaison à l'ubiquitine (UBD) qui reconnaît les mitochondries marquées à l'ubiquitine et une région d'interaction avec LC3B (LIR) interagissant avec les protéines de la famille ATG8, qui comprend principalement le séquestosome 1 (p62 ou SQSTM1)[187], NBR1 (BRCA1 neighbour, qui ressemble également à p62), NDP52 (Nuclear Dots protein 52, ou CALCOCO2), TAX1BP1 et l'optineurine (OPTN) (**Figure 32C**).

p62 a été le premier récepteur sélectif d'autophagie identifié. Une accumulation d'agrégats positifs à l'ubiquitine et enrichis en p62 a été identifiée dans les cellules présentant une autophagie défectueuse en raison d'un déficit en ATG7, et l'ablation génétique de p62 réduit la quantité d'agrégats positifs à l'ubiquitine.[188] p62 est principalement dégradée dans les lysosomes par l'autophagie, ce qui indique qu'il fonctionne comme un adaptateur d'autophagie pour transporter les inclusions positives à l'ubiquitine vers les lysosomes. Il existe de nombreux adaptateurs, régulateurs et partenaires protéiques de voie PINK1-Parkin, dont la liste et la mécanistique sont très bien retranscrites par Shouliang Wang et ses collèges en 2023.[189]

1.5.3.4. La mitophagie Parkin-indépendante

Même s'il existe des voies de mitophagie complexes qui peuvent ou non utiliser PINK1 et Parkin à des fins autres que l'ubiquitination de protéines de l'OMM[189], la mitophagie Parkin-indépendante est essentiellement initiée par des récepteurs au LC3B situés dans l'OMM, à l'exception de la cardiolipine qui peut également jouer ce rôle. Leur nombre est important, ce qui crée une complexité d'analyse des voies empruntées lors de différents cas pathologiques, suggérant qu'une approche de visualisation de la mitophagie vaut mieux qu'une analyse d'expression des différents récepteurs.

Voici une liste des principaux médiateurs de la mitophagie Parkin-indépendante (**Figure 34**) et de leurs mécanismes d'action.

MUL1 est une ubiquitine ligase E3 intégrée dans l'OMM avec un domaine RING faisant face au cytoplasme, elle possède de nombreux substrats mitochondriaux identiques à ceux de Parkin, comme DRP1 et MFN1/2.[190] MUL1 peut réguler la morphologie mitochondriale et stimuler la fission mitochondriale par la SUMOylation de DRP1 et l'ubiquitination de MFN2. La surexpression de MUL1 compense la perte de PINK1 ou de Parkin dans la Maladie de Parkinson, améliorant les phénotypes induits par les mutations de PINK1 et de Parkin dans les neurones dopaminergiques et les muscles, ce qui indique

que MUL1 agit en parallèle de la voie PINK1-Parkin.[190] Notamment, MUL1 agit en amont de PINK1 et favorise sa stabilité, induisant la mitophagie indépendamment de la dépolarisation mitochondriale.[191]

BNIP3 est une protéine de l'OMM appartenant à la famille des protéines Bcl-2 BH3 seul et elle est présente dans divers types de cellules. BNIP3 est impliquée dans divers processus cellulaires, notamment l'apoptose, le dysfonctionnement mitochondrial et la mitophagie. BNIP3 est exprimée constitutivement sous forme de monomère inactif dans le cytosol. En réponse aux signaux de stress (tels que l'hypoxie), BNIP3 forme un homodimère stable via son CTD et s'ancre à l'OMM.[192] Le NTD de BNIP3 contient un motif LIR entouré de deux résidus de sérine, Ser17 et Ser24 dont la phosphorylation est essentielle pour la liaison de BNIP3 à GABARAPL2 et LC3B. ULK1 phosphoryle BNIP3 à la position Ser17 et augmente sa stabilité en réduisant sa dégradation par le protéasome, promouvant ainsi la mitophagie.[193]

NIX est fortement homologue à BNIP3. En effet, il appartient à la même famille de protéines et dispose des mêmes domaines. La mutation à la position Ser212 dans le C-terminal de NIX altère sa capacité à former des homodimères, diminuant de fait la reconnaissance LC3A-NIX et la mitophagie. Etonnamment, la mitophagie médiée par la phosphorylation des résidus Serine de NIX peut se produire dans une voie indépendante de LC3.[194] De plus, la mitophagie médiée par NIX est nécessaire à la différenciation des cellules ganglionnaires rétiniennes.[195] Bien que NIX soit reconnue pour jouer un rôle irremplaçable dans divers processus cellulaires, il reste à élucider comment et quand elle est activée dans ces processus.

FUNDC1 est une protéine de l'OMM exprimée de manière ubiquitaire. Sous l'effet d'un stress comme un découplage, la protéine FUNDC1 interagit avec LC3B via son motif LIR situé dans la région N-terminale exposée au cytoplasme. La mitophagie induite par FUNDC1 ou par l'hypoxie est significativement inhibée dans les cellules déficientes en ATG5, mais pas dans les cellules déficientes en ATG6/Beclin-1, ce qui suggère que la mitophagie médiée par FUNDC1 dépend d'ATG5.[196]

La régulation de la phosphorylation et de la déphosphorylation de FUNDC1 est essentielle à son interaction avec LC3 et à la régulation ultérieure de la mitophagie. L'AMPK, une protéine clé dans la détection des changements de statuts énergétiques dans la cellule, induit le recrutement d'ULK1 dans les mitochondries en cas de déficience énergétique. ULK1 phosphoryle FUNDC1 à la position Ser17, favorisant l'interaction entre FUNDC1 et la Lysine en position 49 de LC3B, puis la mitophagie.[196] La chaîne latérale de LC3B subit un réarrangement structurel pour s'adapter à la phosphorylation de FUNDC1, servant ainsi de capteur pour sa phosphorylation. En revanche, d'autres phosphorylations de FUNDC1 peuvent bloquer sa liaison avec LC3B, notamment par la caséine kinase 2. De

plus l'état de phosphorylation de FUNDC1 peut réguler la dynamique mitochondriale via son interaction avec DRP1 ou OPA1.[197]

BCL2L13 (Bcl-rambo) interagit également avec LC3B via une séquence LIR, formant un complexe LC3B/ULK1/BCL2L13. Il a été rapporté que le domaine LIR dans BCL2L13 se lie sélectivement à GABARAP, GABARAP-L et LC3C pour favoriser la mitophagie, tandis que la mutation Q277C/Q278I dans le domaine LIR améliore sa liaison à LC3B, indiquant que, selon les conditions, BCL2L13 peut se lier à différentes protéines de la famille LC3/GABARAP pendant l'induction de la mitophagie.[198]

AMBRA1 est régulée par Beclin-1, et recrutée dans l'OMM pendant la dépolarisation mitochondriale, puis elle interagit avec le complexe ATAD3A pour favoriser la stabilité et donc l'accumulation de PINK1. De plus, AMBRA1 peut induire la mitophagie indépendamment de la voie Parkin en recrutant HUWE1 qui ubiquitine les protéines de l'OMM (principalement MFN2).[199]

Mcl-1 est membre de la famille pro-survie BCL-2 qui recrute également HUWE1. Au cours de la mitophagie médiée par AMBRA1, Mcl-1 est phosphorylé par GSK-3 à la position Ser159 et dégradée de manièreHUWE1-dépendante. Mcl-1 contient trois motifs LIR canoniques à son extrémité C-terminale. Cependant, les mutations dans ses trois motifs LIR n'abrogent pas entièrement la mitophagie, ce qui suggère que des mécanismes autres que la voie LC3 peuvent également contribuer à la mitophagie favorisée par Mcl-1. De plus, l'interaction entre Mcl-1 et BNIP3 augmente au début de l'hypoxie et sous traitement au FCCP, ce qui suggère que Mcl-1 peut favoriser la mitophagie par l'intermédiaire de BNIP3. En conclusion, Mcl-1 peut réguler la mitophagie par diverses voies.[200] Il est donc essentiel de comprendre comment Mcl-1 bascule entre différentes voies dans des conditions physiologiques et physiopathologiques.

La cardiolipine (CL) est un phospholipide spécifique de l'IMM caractérisé par un squelette glycérol lié à deux lipides phosphatidyliques.[201] La CL interagit et stabilise les protéines de la chaîne respiratoire qui comprennent l'ATP synthase, les complexes IV, III et I. Dans des conditions normales, la CL est distribuée de manière asymétrique entre l'OMM (3 %) et l'IMM (97 %), formant un gradient en réponse aux changements de l'homéostasie mitochondriale. Lorsque les mitochondries sont découplées, la CL se lie à NDPK-D pour être externalisée de l'IMM vers l'OMM puis reconnue par LC3A/B.[202]

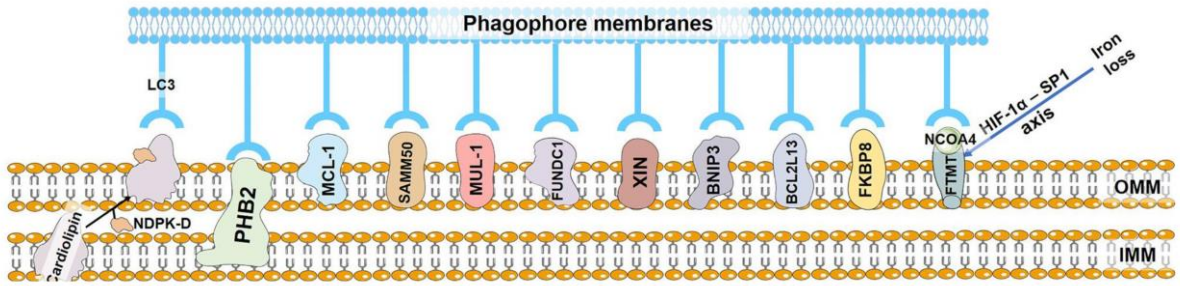


Figure 34 : Mitophagie indépendante de PINK1-Parkin

La cardiolipine, PHB2, MCL-1, SAMM50, MUL-1, FUNDC1, NIX, BNIP3, BCL2L13 et FKBP8 peuvent se lier individuellement à LC3 pour assurer la mitophagie. La perte de fer entraîne une altération de la dégradation de HIF1α, améliorant l'expression de FTMT via l'axe HIF1α - SP1. L'interaction de FTMT localisée à l'OMM avec NCOA4 augmente la colocalisation de FTMT avec LC3, favorisant ainsi la mitophagie. De Wang *et al.*, 2023.

1.6.3.4. Le flux mitophagique

Le flux autophagique fait référence au processus dynamique de l'autophagie, depuis le début de la formation de l'autophagosome jusqu'à la dégradation de son contenu après la fusion avec les lysosomes.

Pour évaluer l'activité autophagique, les chercheurs utilisent généralement l'analyse Western blot de LC3B et p62. Les niveaux de LC3B-II reflètent le nombre d'autophagosomes, mais ils ne font pas la différence entre une formation accrue d'autophagosomes et une dégradation altérée dans les lysosomes. Par conséquent, la mesure du flux nécessite d'analyser les niveaux de LC3B-II en présence et en l'absence d'inhibiteurs de l'autophagie comme la chloroquine ou la bafilomycine A1, qui bloquent la fusion des autophagosomes avec les lysosomes.[203] Si l'autophagie est active, les niveaux de LC3B-II devraient s'accumuler lorsque la dégradation est bloquée, indiquant un flux en cours. De même, p62, un récepteur de charge qui se lie aux protéines ubiquitinées et est dégradé dans les autolysosomes, sert d'autre marqueur. Des niveaux réduits de p62 indiquent une dégradation autophagique active mais son accumulation en présence d'un inhibiteur reflète également un flux autophagique actif.[204]

Bien que le Western blot soit une méthode largement utilisée pour étudier le flux autophagique, il n'est pas sans limites, notamment en raison de sa dépendance aux inhibiteurs et de sa nature semi-quantitative. De plus, pour étudier la mitophagie il faut cibler des marqueurs spécifiques, ce qui peut s'avérer très fastidieux dans le cas d'une mitophagie Parkin-indépendante, vu le nombre d'initiateurs potentiels. Pour remédier à ces limitations, des outils avancés tels que mito-QC et mito-SRAI ont été développés,

offrant une surveillance plus précise et en temps réel de la mitophagie. Mito-QC est un système de rapport génétiquement codé qui utilise une double étiquette de fluorescence pour surveiller la livraison des mitochondries aux lysosomes. Cet outil tire parti de la nature sensible au pH de l'un des fluorophores (RFP et GFP), ce qui permet une visualisation claire des mitochondries à l'intérieur des lysosomes acides après la mitophagie.[205] Il est devenu la référence pour les études de mitophagie *in vivo* en raison de sa fiabilité et de sa capacité à suivre la dégradation mitochondriale en temps réel dans différents tissus du modèle murin.

Une nouvelle technique passionnante est le mito-SRAI (Mitochondria Selective Ratiometric Autophagy Indicator). Cette méthode utilise le FRET (Förster Resonance Energy Transfer) pour détecter la mitophagie avec une plus grande précision que le mito-QC. Le système basé sur le FRET est plus sensible aux changements de proximité des mitochondries et des lysosomes, offrant une résolution temporelle et spatiale plus fine des événements mitophagiques. Bien qu'elle soit encore émergente, cette approche promet de devenir l'outil le plus précis disponible à ce jour pour surveiller le renouvellement mitochondrial.[206] Grâce à ces avancées, il est désormais possible de mesurer la mitophagie avec une précision sans précédent, surmontant ainsi de nombreuses limitations inhérentes aux méthodes traditionnelles.

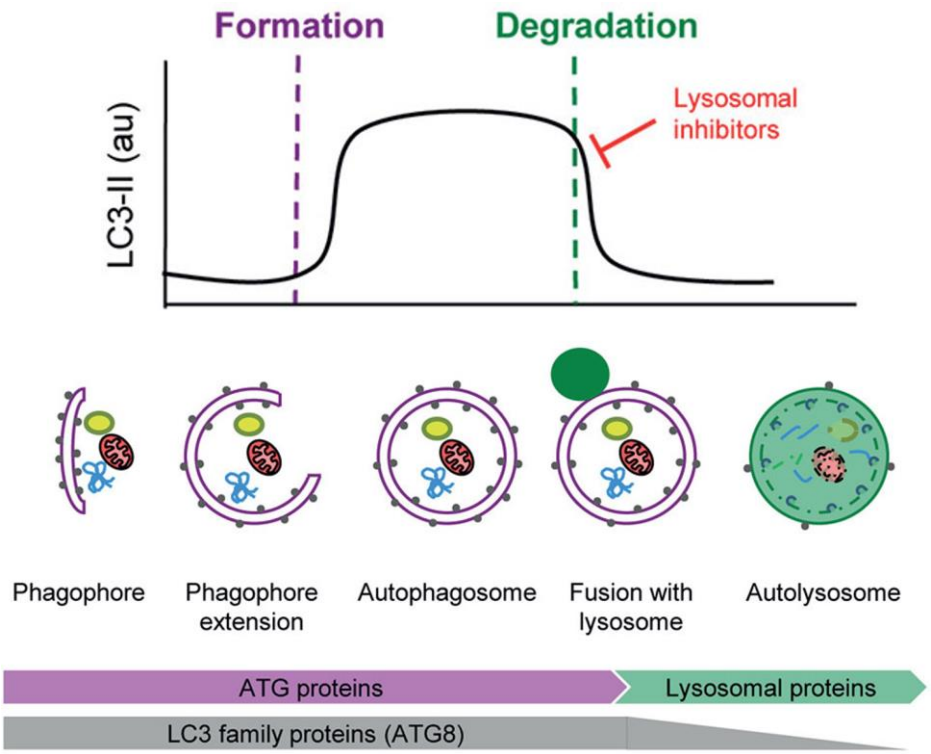


Figure 35 : Flux autophagique

Adapté de A. Plaza-Zabala *et al.*, 2021.[207]

1.6.3.5. Pathologies associées à la mitophagie

Nous savons maintenant que la mitophagie est essentielle à l'homéostasie cellulaire, en particulier dans les tissus métaboliquement actifs. Il n'est donc pas surprenant que des défauts de mitophagie soient impliqués dans de nombreuses maladies, notamment les troubles neurodégénératifs, les maladies cardiovasculaires, les dystrophies musculaires et les pathologies oculaires, ainsi que dans le processus de vieillissement (**Figure 36**).

1.6.3.5.1. Neurodégénérescence

L'un des liens les plus importants entre le dysfonctionnement de la mitophagie et la neurodégénérescence est observé dans la maladie de Parkinson. Les mutations du gène *PARK2*, qui code l'ubiquitine ligase E3 Parkin, perturbent l'élimination des mitochondries endommagées, contribuant à la mort des neurones dopaminergiques.[173,175]

Dans la maladie de Huntington, les protéines huntingtines anormales interfèrent avec la dynamique mitochondriale et la mitophagie. Ces défauts entraînent une augmentation du stress oxydant et un dysfonctionnement mitochondrial, qui contribuent à la dégénérescence neuronale observée.[208] De même, dans la maladie d'Alzheimer (MA), l'altération de la mitophagie est liée à l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles dans les neurones, contribuant à une augmentation des dommages oxydatifs et des agrégats de peptide bêta-amyloïde.[209] Collectivement, ces troubles neurodégénératifs démontrent le rôle crucial de la mitophagie dans le maintien de l'homéostasie neuronale et la prévention de la neurotoxicité.

1.6.3.5.2. Maladies cardiovasculaires

Dans le contexte des maladies cardiovasculaires, une mitophagie altérée a été associée à des affections telles que les lésions d'ischémie-reperfusion, l'insuffisance cardiaque, la production de ROS et à la mort des cardiomyocytes. En effet, la mitophagie médiée par Parkin est essentielle pour protéger le cœur pendant les phases de stress. De plus, une diminution de la capacité mitophagique a été mise en cause dans la progression de l'athérosclérose, et de l'inflammation.[210]

1.6.3.5.3. Myopathies

Les maladies musculaires telles que la dystrophie musculaire de Duchenne (DMD) montrent également une altération de la mitophagie. Dans la DMD, l'élimination défectueuse des mitochondries endommagées entraîne une augmentation de la production de ROS et une dégénérescence des fibres musculaires, ce qui aggrave le phénotype de la maladie.[211]

1.6.3.5.4. Vieillissement

Les défauts de mitophagie sont également étroitement liés aux phénotypes de vieillissement dans de nombreux tissus, notamment le cœur, le muscle squelettique et l'œil. Dans le cœur vieillissant, le déclin de la mitophagie entraîne l'accumulation de mitochondries dysfonctionnelles, contribuant à une diminution de la fonction cardiaque et à une susceptibilité accrue à l'insuffisance cardiaque.[212] Lors du vieillissement musculaire, la mitophagie réduite contribue à la sarcopénie en favorisant le dysfonctionnement mitochondrial et le stress oxydant, ce qui conduit à une atrophie musculaire.[213] De même, dans l'œil vieillissant, la mitophagie réduite est associée à la dégénérescence rétinienne et à l'apparition de maladies comme la DMLA, où les dommages oxydatifs accélèrent les processus de vieillissement cellulaire.[209] L'implication généralisée des défauts de mitophagie dans le vieillissement pathologique et physiologique souligne le rôle essentiel du contrôle de la qualité mitochondriale dans le maintien de la santé des tissus tout au long de la vie.

La machinerie complexe du CQ de l'ADNmt est d'une importance capitale chez les mammifères et un seul grain de sable dans son rouage peut avoir des conséquences pathologiques désastreuses.[96,122,214] Ces pathologies sont en grande partie dégénératives et leur facteur de risque majeur est l'âge. Les mutations de l'ADNmt sont elles-mêmes étroitement corrélées à l'âge[12], ce qui a motivé de nombreuses études sur la place de la mitochondrie dans le processus de vieillissement.

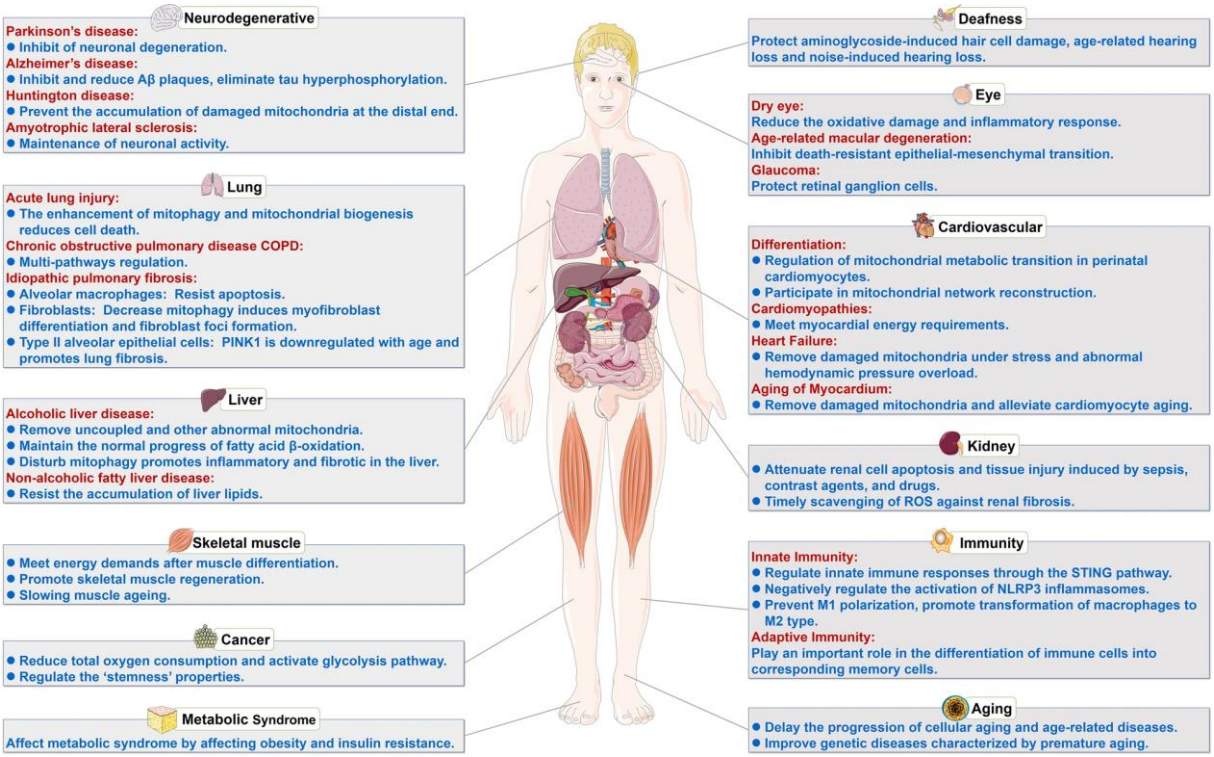


Figure 36 : Pathologies associées à des défauts de mitophagie

De Wang *et al.*, 2023

1.7.Le vieillissement

1.7.3. La place du vieillissement dans la société moderne

Selon l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé), le vieillissement est : « le produit de l'accumulation d'un vaste éventail de dommages moléculaires et cellulaires au fil du temps, entraînant une dégradation progressive des capacités physiques et mentales, une majoration du risque de maladie et, enfin, le décès ».[215] Selon le département des affaires économiques et sociales des Nations Unies, la proportion de personnes âgées augmente à un rythme sans précédent et d'ici 2050 le nombre de personnes de plus de 65 ans dépassera les 2 milliards, soit 2 fois la population d'enfants de 5 ans ou moins, alors qu'elle était de 3 fois inférieure en 1950 (**Figure 37**).

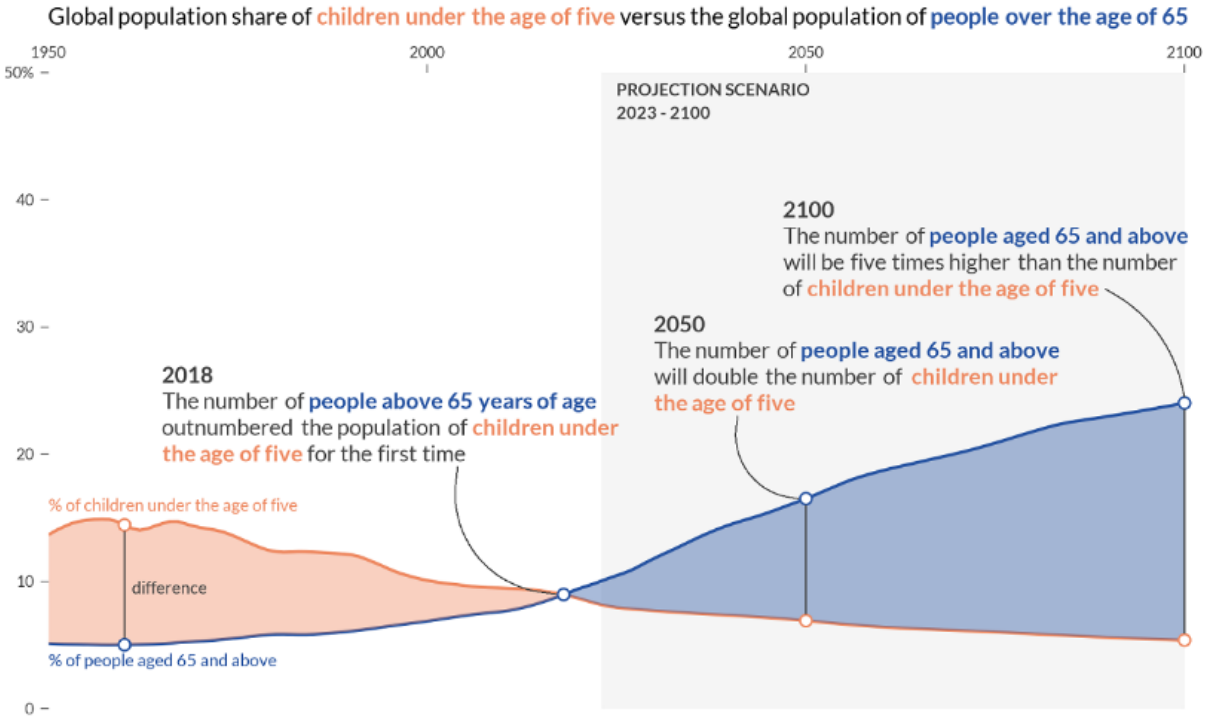


Figure 37 : Répartition semi-prévisionnelle de la population mondiale âgée de moins de 5 ans ou plus de 65 ans entre 1950 et 2100

United Nations World Population Prospects, 2022, via OurWorldInData.org. De P. Alvarez.

Ce vieillissement s'explique par deux facteurs. D'une part, l'augmentation de l'espérance de vie qui, grâce aux progrès continus de la médecine et l'amélioration du niveau de vie, a doublé lors des deux derniers siècles.[216] D'autre part, nous assistons à une diminution du taux de naissances, liée entre autre à l'expansion des techniques et services de contraception[217] ainsi qu'à un désir de procréation amoindri dans les sociétés modernes des pays développés ou en développement[218], expliqué notamment par le choix de privilégier la carrière professionnelle, ou encore la peur de la qualité de vie des générations futures[219], face aux défis écologiques et la surpopulation mondiale.

Le déséquilibre entre naissance et décès à la base du vieillissement de la population mondiale engendre de nombreux défis sociétaux. En effet, d'une part le système économique des aides aux personnes âgées comme les retraites doit être repensé car bientôt un jeune actif devra travailler pour payer les retraites de deux personnes âgées. D'autre part les coûts en termes de santé, déjà multipliés par 6 entre 1970 et 1990, aux USA et plusieurs pays d'Europe de l'Ouest comme la France, ne cessent de croître à cause du développement des maladies chroniques liées à l'âge, que ce soit en termes d'hospitalisation ou de soin.[220]

Si le vieillissement est un processus universel, sa corrélation à de nombreuses maladies chroniques fait qu'il est considéré lui-même comme un état pathologique, à cause notamment de la perte de fonctions motrices et cognitives impliquée ainsi que son issue fatale. C'est pourquoi, depuis des millénaires, l'Homme cherche en vain un remède à ce vieillissement dit pathologique. Depuis l'empereur Qin Shi Huang, connu pour son armée de près de 8000 soldats en terre cuite qui s'essaya à la consommation de mercure pour ne jamais mourir, en passant par la quête infatigable des alchimistes pour l'obtention de la pierre philosophale et jusqu'à la recherche moderne, quand en 1925, Northrop découvre l'impact de l'intensité lumineuse sur le développement et l'espérance de vie des drosophiles.[221] En 1939 l'impact positif de la restriction calorique sur la durée de vie est mis en lumière sur modèles de rongeurs[222] et les travaux sur ceux-ci et C. *Elegans* explosent.

1.7.4. Pathologies associées au vieillissement

Le vieillissement est un facteur de risque majeur pour de nombreuses pathologies : diabètes, arthrose, arthrite, neurodégénérescences telles que les maladies de Parkinson ou Alzheimer, atteintes musculaires (atrophie, sarcopénie, perte de force etc…) et maladies cardiovasculaires (MCV) (**Figure 38**). De plus, un des plus grands risques liés à l'âge et à ces pathologies est celui d'accidents corporels entraînant des fractures du fémur ou du bassin, dus à la perte d'équilibre et de reflexes, aux capacités oculaires réduites ainsi qu'à la fragilisation des os.[223]

1.7.5. Les théories du vieillissement

Les origines du vieillissement ne sont pas encore bien définies et de nombreuses théories ont été formulées au cours de l'évolution des découvertes scientifiques. La première théorie s'appuyant sur des éléments physiologiques, la « théorie du taux de vie » de Raymond Pearl (1928), associant la vitesse du métabolisme à la longévité, est aujourd'hui désuète. En effet, ce rapport n'est absolument pas valable pour toutes les formes de vie, même entre différents mammifères.

S'en suit la « théorie radicalaire du vieillissement » de Denham Harman (1956), impliquant les espèces radicalaires de l'oxygène (Reactive Oxygen Species, ROS), essentiellement produites par les mitochondries lors de la respiration oxydative et dont la particularité physicochimique est de pouvoir interagir fortement avec l'importe quelle

molécule : ADN, ARN, et même protéine, pour altérer sa structure et sa fonction. Cette théorie rencontre de plus en plus d'opposition, notamment par l'apport de modèles de souris transgéniques déficients en enzymes de détoxification telles que les superoxyde dismutases ou glutathion peroxydases, qui présentent des durées de vie similaires aux souris sauvages, sans pour autant écarter l'existence de mécanismes de compensation.[224]

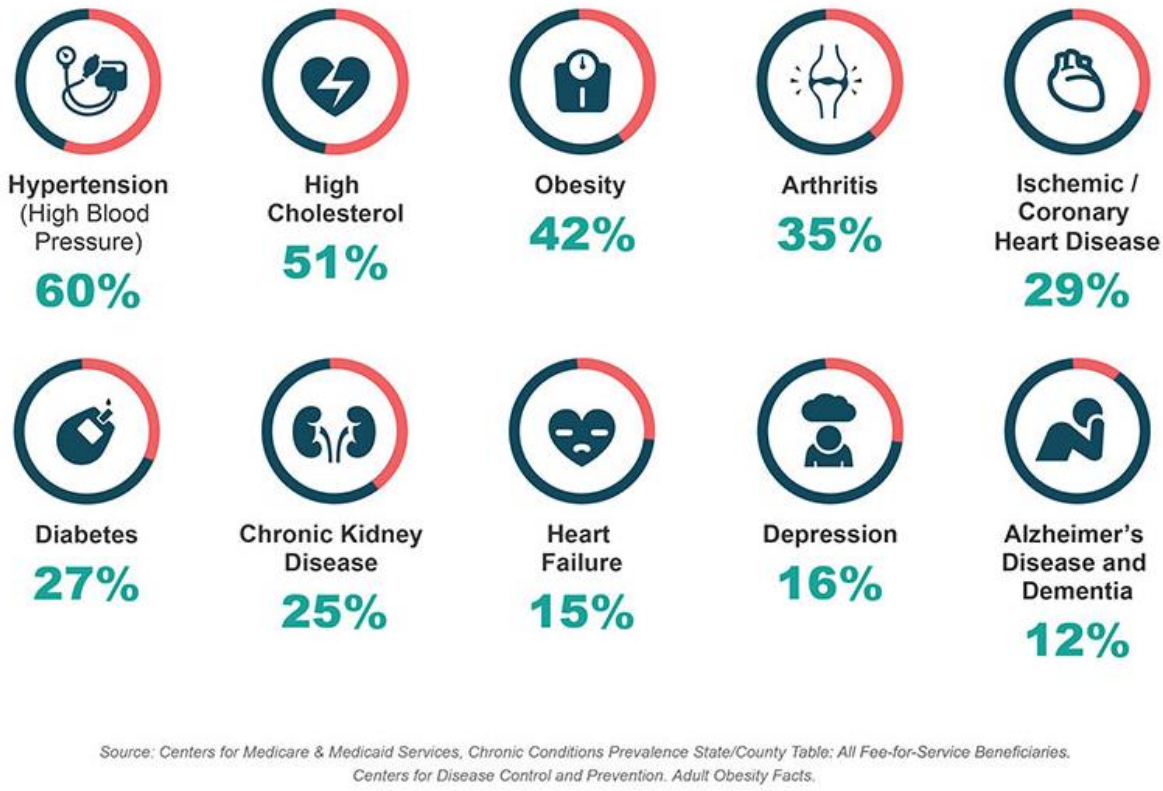


Figure 38 : Top 10 des pathologies chroniques liées à l'âge

Pourcentage de personnes âgées de plus de 65 ans touchées par les pathologies associées au vieillissement les plus représentées dans la population. US National Consil on Aging, 2024.

Ces deux théories seront par la suite associées, on parlera alors de « théorie du taux de vie / dommages oxydatifs ».[225] Par la suite, plusieurs nouveaux modèles de vieillissement complémentaires sont apparus et ont donné naissance à deux nouvelles théories. D'une part, la « théorie programmée », qui associe une prédétermination génétique de l'expression de certains facteurs promouvant le vieillissement, le dépérissement du système immunitaire et un contrôle endocrinien, évoluant tous deux de manière prédictible au fur et à mesure des étapes de vie de l'organisme. Celle-ci repose donc essentiellement sur un codage prédestinant toute forme de vie à dépérir. D'autre part la

théorie « d'erreur ou dommages », qui prend tout son sens lorsque l'on observe une variabilité mutationnelle inter-individus pouvant mener à une sélection naturelle. Cette théorie peut s'adapter à la « théorie programmée » et englobe une vaste diversité de dommages moléculaires s'accumulant de manière soit aléatoire soit intrinsèque à certains stress, prédispositions génétiques ou environnementales, en compilant celle du « taux de vie / dommages oxydatifs » ainsi que l'accumulation de dommages à l'ADN (**Figure 39**). Ainsi, les études modernes du vieillissement se focalisent sur deux sous-compartiments intracellulaires : le noyau et les mitochondries, et plus spécifiquement l'ADN qu'ils renferment.

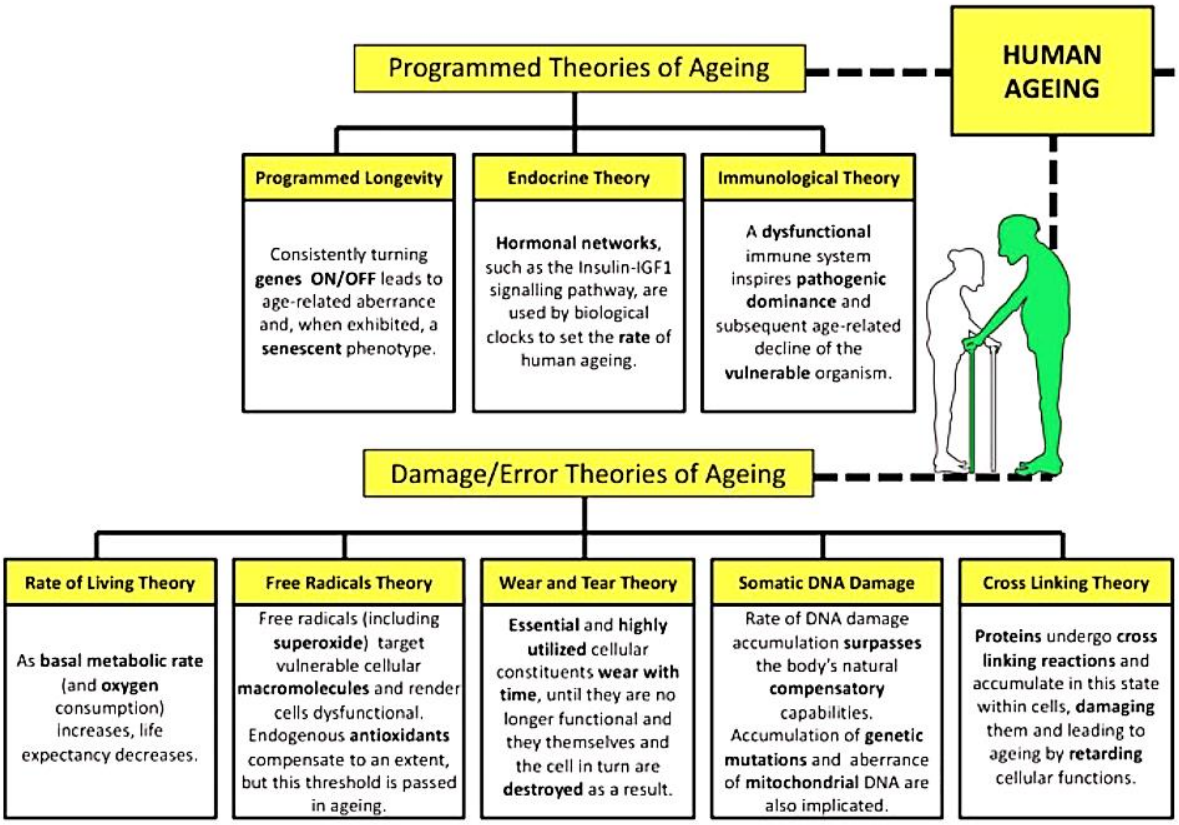


Figure 39 : Synthèse des théories du vieillissement

Adapté de V.A. Pandya & R. Patani, 2019

1.7.6. Les origines du vieillissement

1.7.6.1. Une grande diversité de phénomène

Le vieillissement résulte d'une combinaison de mécanismes devenant dysfonctionnels par accumulation de dommages, en particulier au niveau de l'ADN, qu'il soit nucléaire ou mitochondrial. Au fil des découvertes scientifiques, de nombreux autres facteurs

impliqués dans ce processus ont été identifiés : l'attrition des télomères, les altérations épigénétiques, la perte de protéostase, la dérégulation de la détection des nutriments, le dysfonctionnement mitochondrial, la sénescence cellulaire, l'épuisement des cellules souches, la communication intercellulaire altérée[226], l'inflammaging, la dysbiose et l'altération de la macroautophagie (**Figure 40**).[227]

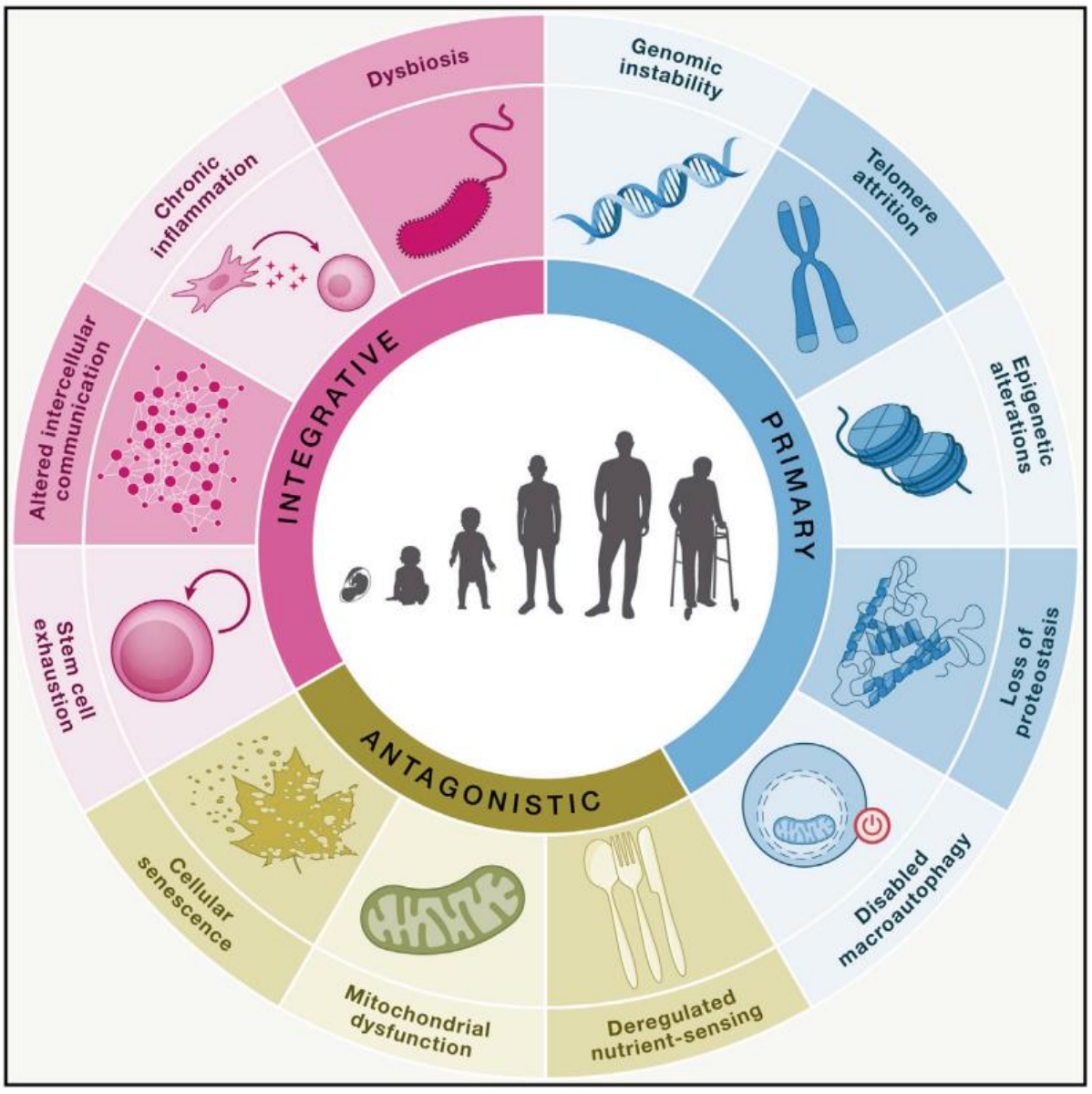


Figure 40 : L'origine multifactorielle du vieillissement

C. López-Otín *et al.*, 2023.

1.7.6.2. Vieillissement mitochondrial

1.7.6.2.1. Impact global

L'impact de la dysfonction mitochondriale au cours du vieillissement ne se limite pas à une déficience énergétique, puisque les mitochondries sont aussi impliquées dans l'inflammation (lorsque des ROS ou de l'ADNmt s'échappent de l'organite provoquant l'activation des inflammasomes ou des capteurs d'ADN cytosolique, respectivement) et la mort cellulaire.[228] Avec le vieillissement, la fonction mitochondriale se détériore en raison de multiples mécanismes reliés entre eux, notamment l'accumulation de mutations de l'ADNmt, une protéostase déficiente conduisant à la déstabilisation des complexes de la chaîne respiratoire, un renouvellement réduit des organites et des changements dans la dynamique mitochondriale. Cette situation compromet la contribution des mitochondries à la bioénergétique cellulaire, stimule la production de ROS et peut déclencher une perméabilisation accidentelle des membranes mitochondriales provoquant une inflammation et la mort cellulaire.[229]

1.7.6.2.2. Phénotypes mitochondriaux

Les patients porteurs de mutations de l'ADNmt présentent souvent une biogenèse mitochondriale accrue, comme dans les fibres musculaires rouges et déchiquetées du muscle squelettique (Ragged Red Fibrers, RRF). De plus, plusieurs modèles de souris KO présentant une altération tissu-spécifique de la maintenance de l'ADNmt[230,231] de la transcription mitochondriale[232] ou de la traduction mitochondriale[233] voient leur masse mitochondriale accrue dans les tissus affectés. On suppose généralement que cette accumulation de mitochondries est causée par l'activation de la biogenèse mitochondriale en réponse à une production d'énergie déficiente. Des expériences sur des souris présentant une déplétion de l'ADNmt dans le muscle squelettique ont montré que l'activation de la biogenèse mitochondriale peut au moins en partie compenser la fonction mitochondriale déficiente et maintenir une production globale d'ATP proche de la normale dans le tissu affecté.[231]

1.7.6.2.3. Mitophaging

Il existe de plus en plus de preuves que la mitophagie a un impact sur la santé et l'espérance de vie dans différents organismes modèles. En utilisant une souche de souris transgénique qui exprime le rapporteur de mitophagie fluorescent mt-Keima (proche de la construction mito-QC), un niveau de mitophagie diminué a été observé dans le gyrus

denté de l'hippocampe chez des souris de 21 mois par rapport aux souris de 3 mois.[234] Une diminution de la mitophagie a également été observée dans les cœurs de souris âgées[269], ce qui influence diverses pathologies cardiaques.[212] D'autres types cellulaires dans les tissus âgés sont également caractérisés par une mitophagie altérée, comme les cellules satellites du muscle squelettique chez la souris[235] ou l'Homme.[236]

L'effet des changements de la mitophagie sur la santé et la durée de vie a été particulièrement démontré en utilisant les organismes modèles C. *elegans* et D. *melanogaster*. Plusieurs études génétiques sur D. *melanogaster* ont révélé que la surexpression de gènes impliqués dans la dynamique mitochondriale ou la mitophagie conduit à une amélioration de la santé et/ou de l'espérance de vie, comme par exemple *DRP1*[237] ou *SQSTM1* (p62).[238] L'allongement de l'espérance de vie chez D. *melanogaster* a également été observé après surexpression de Parkin et PINK1, contrecarrant l'augmentation des niveaux de MFN2 observée au cours du vieillissement.[239] Ces résultats sont cohérents avec les études sur C. *elegans*, où il a été démontré que la mitophagie contribue à la régulation de la durée de vie.[240] De toute évidence, ces données soutiennent un rôle important de la mitophagie dans le vieillissement, d'où le terme « mitophaging ».

1.7.6.2.4. Accumulation de mutations ponctuelles de l'ADNmt

Les patients atteints de maladies mitochondriales présentent une expansion monoclonale d'ADNmt muté conduisant à des niveaux élevés d'un seul type de mutation, alors que le vieillissement est associé à des expansions clonales également mais conduisant à de faibles niveaux de nombreux types différents de mutations de l'ADNmt.[241] Il était généralement admis que les mutations somatiques de l'ADNmt associées à l'âge sont causées par des dommages accumulés au cours du processus de vieillissement.[242] Cependant, une autre hypothèse est que la plupart des mutations de l'ADNmt sont créées par des erreurs de réplication pendant l'embryogenèse et subissent ensuite une expansion clonale à l'âge adulte.[66] L'implication des mutations ponctuelles de l'ADNmt dans le processus de vieillissement a été confortée par les résultats obtenus sur le modèle de souris mtDNA mutator, qui développe un syndrome de vieillissement prématuré.[74] Le phénotype des souris mutator est tout à fait cohérent avec l'idée selon laquelle les mutations ponctuelles de l'ADNmt créent des substitutions d'acides aminés des sous-unités de la chaîne respiratoire, ce qui explique le déclin observé de la stabilité des complexes de la chaîne respiratoire.[243] Il est intéressant de noter que la charge de mutations ponctuelles est déjà élevée pendant l'embryogenèse chez les souris mutator, mais les symptômes de vieillissement ne sont pas observés avant le début de la vie adulte, et il n'existe aucune preuve d'augmentation du stress oxydant.[244] Les résultats

obtenus chez ces animaux soutiennent donc l'hypothèse selon laquelle les mutations somatiques de l'ADNmt créées pendant l'embryogenèse peuvent contribuer à aux phénotypes du vieillissement à l'âge adulte.

1.7.6.2.5. Accumulation de délétions de l'ADNmt

L'expansion clonale de copies d'ADNmt présentant une délétion est une caractéristique bien décrite du vieillissement mitochondrial[245], notamment au niveau cardiaque.[78] Ainsi, la délétion commune de 4977 pb est retrouvée en proportion plus importante chez les patients adultes atteints de fibrillation atriale.[246] Une étude portant sur les fibres musculaires d'humains décédés a révélé que la proportion de fibres COX^- augmentaient de 6 % à 31 % entre 49 et 92 ans, et que dans ces dernières, certaines molécules d'ADNmt ont jusqu'à 90 % de leur longueur délétée.[77] Par ailleurs, la délétion commune de 4977 pb a également été retrouvée dans les muscles squelettiques chez deux fois plus de patients atteints de diabète ou d'intolérance au glucose que chez les individus sains du même âge (55-75 ans).[247]

La fréquence et le type des délétions de l'ADNmt qui s'accumulent avec l'âge peuvent différer selon les tissus humains. Ainsi, un séquençage de nouvelle génération d'échantillons post-mortem de putamen de sujets âgés a révélé que la délétion commune de 4977 pb était la plus abondante[248], alors qu'une approche similaire dans les muscles squelettiques a révélé un plus grand nombre d'autres types de délétions sur l'arc majeur.[80] Malgré tout, le type de délétion globalement le plus fréquent chez l'Homme reste cette délétion commune de 4977 pb, retrouvée dans de nombreux tissus au cours du vieillissement et qui peut être un biomarqueur potentiel des dommages oxydatifs, notamment dans le coeur.[249]

1.7.6.2.6. Instabilité de l'ADNmt et apoptose

Il a été initialement démontré que la présence d'ADNmt n'est pas nécessaire à l'exécution de l'apoptose *in vitro*.[250] Cependant, une étude ultérieure a montré que la déplétion d'ADNmt causée par l'inactivation de *TFAM* chez la souris conduit à une augmentation de l'apoptose *in vivo*.[251] Depuis, ce phénomène a été rapporté dans une variété de tissus présentant une déplétion d'ADNmt dans des modèles de souris : le cœur[251], les neurones pyramidaux[252], les neurones dopaminergiques[253] et les cellules β pancréatiques[254]. Outre ces exemples de déplétion tissulaire d'ADNmt, une augmentation de l'apoptose a été mise en évidence dans différents tissus de la souris mtDNA mutator[255,256] et dans l'épiderme d'un modèle tissu-spécifique d'accumulation de délétions larges de l'ADNmt, la

souris K320E-Twinkle^{Epi}.[257] Ainsi, il est envisageable que l'expansion clonale de mutations somatiques de l'ADNmt observée au cours du vieillissement humain puisse contribuer à la perte cellulaire au sein des tissus.[227]

1.8. Le cœur

1.8.1. Structure et fonction

Le rôle du cœur est de faire circuler le sang dans les tissus en permettant sa réoxygénation dans les poumons. Ainsi, l'O_2 est transporté par les groupements prosthétiques hèmes des érythrocytes (en oxydant le fer qu'ils contiennent) présents dans le sang, jusqu'aux mitochondries. Là, l'oxygène participe à la respiration cellulaire en tant qu'accepteur final des électrons dans le processus de phosphorylation oxydative (**Figure 7**), mécanisme indispensable au cœur lui-même puisqu'il génère l'énergie indispensable à son fonctionnement.

Le sang arrive désoxygéné au niveau des veines caves dans l'oreillette gauche et pénètre passivement dans le ventricule gauche. Il est ensuite dirigé vers les poumons via la veine pulmonaire où il est réoxygéné, puis revient vers le cœur pour se déverser dans l'oreillette droite et enfin le ventricule droit, afin d'être réparti dans le système vasculaire via l'aorte (**Figure 41**).

L'impulsion mécanique potentialisant cette dynamique des fluides est la contraction cardiaque. Elle est assurée par les cardiomyocytes (CM), occupant environ 50 % du ventricule, le reste étant composé majoritairement de fibroblastes, de cellules endothéliales et de péricytes. Les 10 % de cellules les moins représentées dans le ventricule sont des cellules neuronales, musculaires lisses, myéloïdes, lymphoïdes et des adipocytes.[258] La contraction cardiaque se décompose en trois étapes : la diastole, durant laquelle toutes les cavités se remplissent passivement, la systole auriculaire qui permet la contraction des oreillettes afin de transvaser le sang vers les ventricules puis, enfin, la systole ventriculaire qui éjecte le sang du cœur vers la circulation sanguine s'il est oxygéné, vers les poumons s'il ne l'est pas. L'induction de cette contraction, et par conséquent du pouls, est électrique et influencée par le système nerveux autonome. Il s'agit d'une impulsion rythmée générée par un groupe de CM conducteurs ayant la capacité de produire des potentiels d'action sans atteindre de potentiel de repos, et qui forment le nœud sino-atrial (SA). En effet, grâce à un set de canaux « FUNNY » spécifiques à cette fonction, les cellules du nœud SA présentent une entrée de sodium faible mais constante qui va empêcher la post-hyper-polarisation après génération d'un

potentiel d'action, atteignant alors à chaque fois le seuil d'autorythmicité menant à ces impulsions, puis contractions, et enfin au pouls de manière rythmique.[259]

L'impulsion électrique ainsi produite est ensuite transmise via les fibres conductrices internodales au nœud atrio-ventriculaire (AV), qui joue le rôle de relais de l'impulsion et de générateur de secours en cas d'accident. Cette transmission induit alors la systole auriculaire en se propageant aux CM contractiles environnants. Le nœud AV permet ensuite la transmission de l'impulsion dans tout le reste du réseau à savoir le faisceau de His, les branches puis le réseau de Purnkinje, induisant alors la systole ventriculaire.[260]

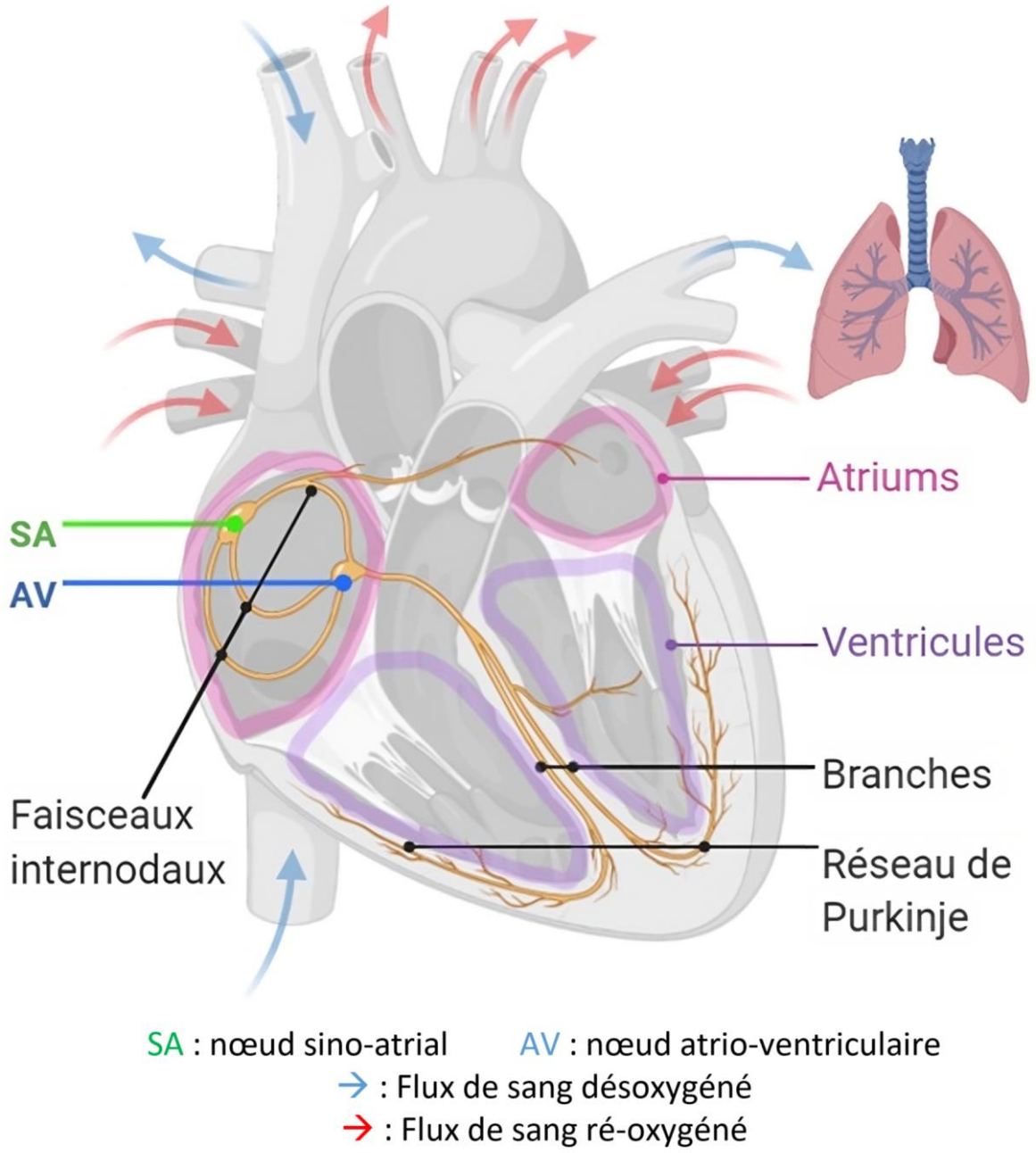


Figure 41 : Caractérisation anatomique du cœur et de son réseau de conduction

1.8.2. Maladies CardioVasculaires (MCV)

Les MCV sont la plus grande cause de mortalité dans le monde. Même si elles sont regroupées sous le même terme, elles peuvent se développer à plusieurs niveaux et être liées à l'âge, à des comorbidités ou juste à des mutations génétiques héréditaires. Elles peuvent par exemple résulter d'altérations du diamètre des vaisseaux sanguins, causées par un anévrisme ou au contraire un défaut d'ouverture des valves. Des plaques d'athérome, en partie causées par des dépôts de cholestérol, peuvent également conduire à une ischémie. Cet amoindrissement de l'apport en oxygène au niveau des tissus peut entrainer une inflammation et une dégradation cellulaire locale qui accentue la perte de capacité de remodelage et même, sur le long terme, peut conduire à la mort des cellules aboutissant à l'infarctus : une nécrose entrainant la perte de capacité contractile du tissu cardiaque sur un trop large segment, engendrant un arrêt cardiaque si elle n'est pas traitée dans l'immédiat.[261]

D'autres pathologies résultent de cette altération de la capacité de remodelage du cœur. Le remodelage cardiaque est essentiel à l'adaptation de la résistance à la puissance du flux sanguin, ainsi qu'à la souplesse et la contractilité du tissu, son altération peut entrainer un épaississement ou au contraire une dilatation des parois cardiaques, une hypertrophie cellulaire ou l'accumulation de fibres de collagène pouvant engendrer une fibrose. Ce collagène ainsi que d'autres protéines de consolidation sont produits par les fibroblastes, remplaçant l'espace laissé libre par la perte de cardiomyocytes. C'est pourquoi le cœur se rigidifie et perd en plasticité. Enfin, il existe également des atteintes du rythme du cœur, regroupées sous le terme d'arythmies cardiaques, qui incluent des contractions prématurées, des perturbations de la conduction entre oreillettes et ventricules (Blocs AV, BAV) et d'autres altérations telles que les tachycardies et bradycardies qui conduisent respectivement à une accélération et une diminution du rythme cardiaque.[262] Ces troubles du rythme peuvent avoir des conséquences dramatiques, et les arythmies ventriculaires sont notamment responsables de la majorité des décès soudains d'origine cardiaque.[65]

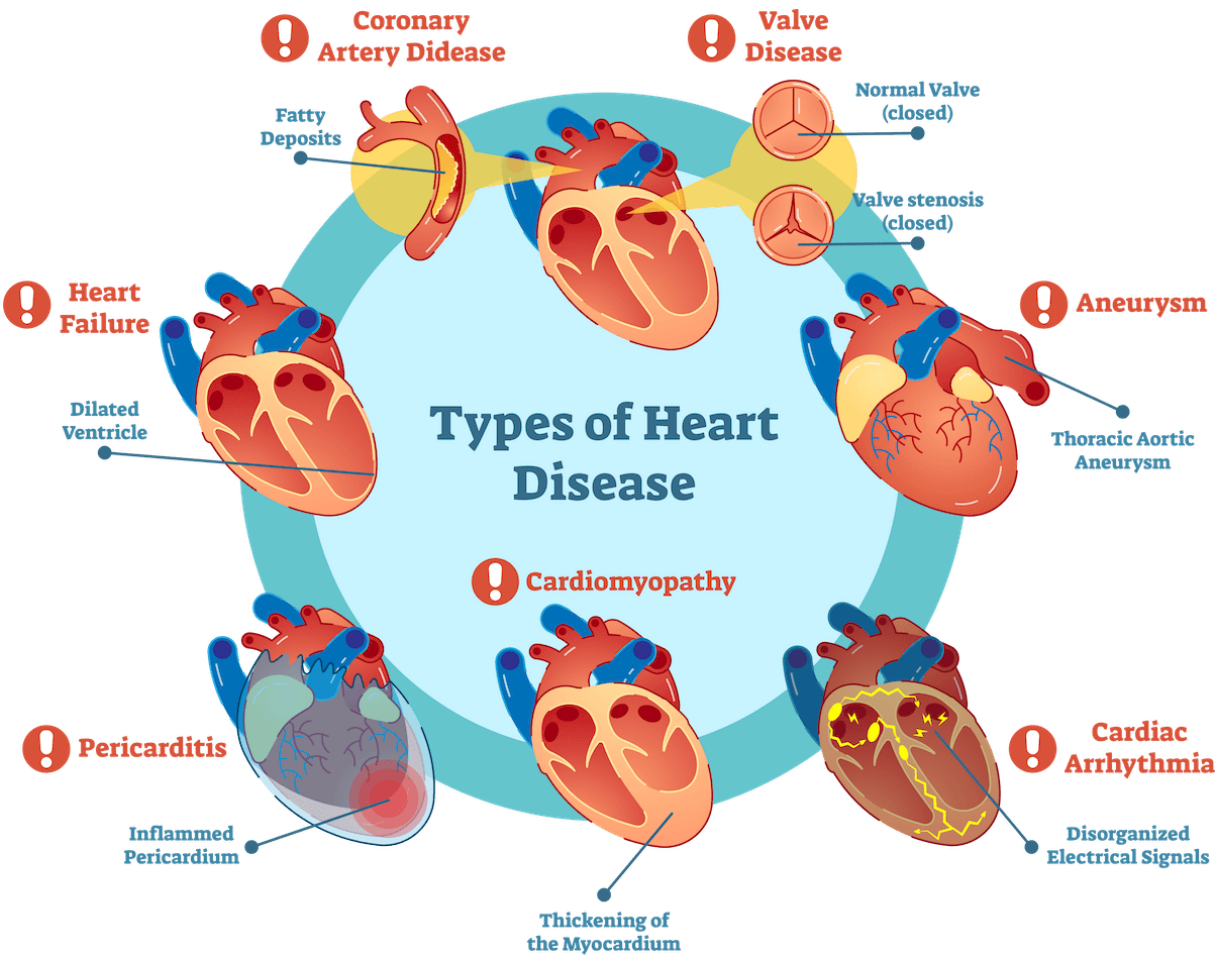


Figure 42 : Types de Maladies CardioVasculaires (MCV)

https://cleanarteries.co.uk/

1.8.3. Le vieillissement cardiaque

Le vieillissement du cœur est associé à un certain nombre de changements phénotypiques pouvant expliquer sa perte de fonction. L'altération de la capacité de remodelage du tissu cardiaque associée à la fibrose et l'hypertrophie a déjà été abordée mais dans le cœur vieillissant est également observée une inflammation chronique induite par la surexpression de NLRP3 conduisant à l'assemblage de l'inflammasome (inflammaging)[263] ainsi qu'une perte de l'homéostasie induisant une agrégation de lipofuscine, un pigment jaune-brun composé de protéines, de lipides et de métaux hautement oxydés (**Figure 43**).[264]

Ensemble, ces changements pourraient participer à l'apparition de troubles de la conduction cardiaque comme des arythmies telles que les battements ventriculaires prématurés, les BAV et la fibrillation auriculaire.[265] Il est en effet admis depuis plusieurs

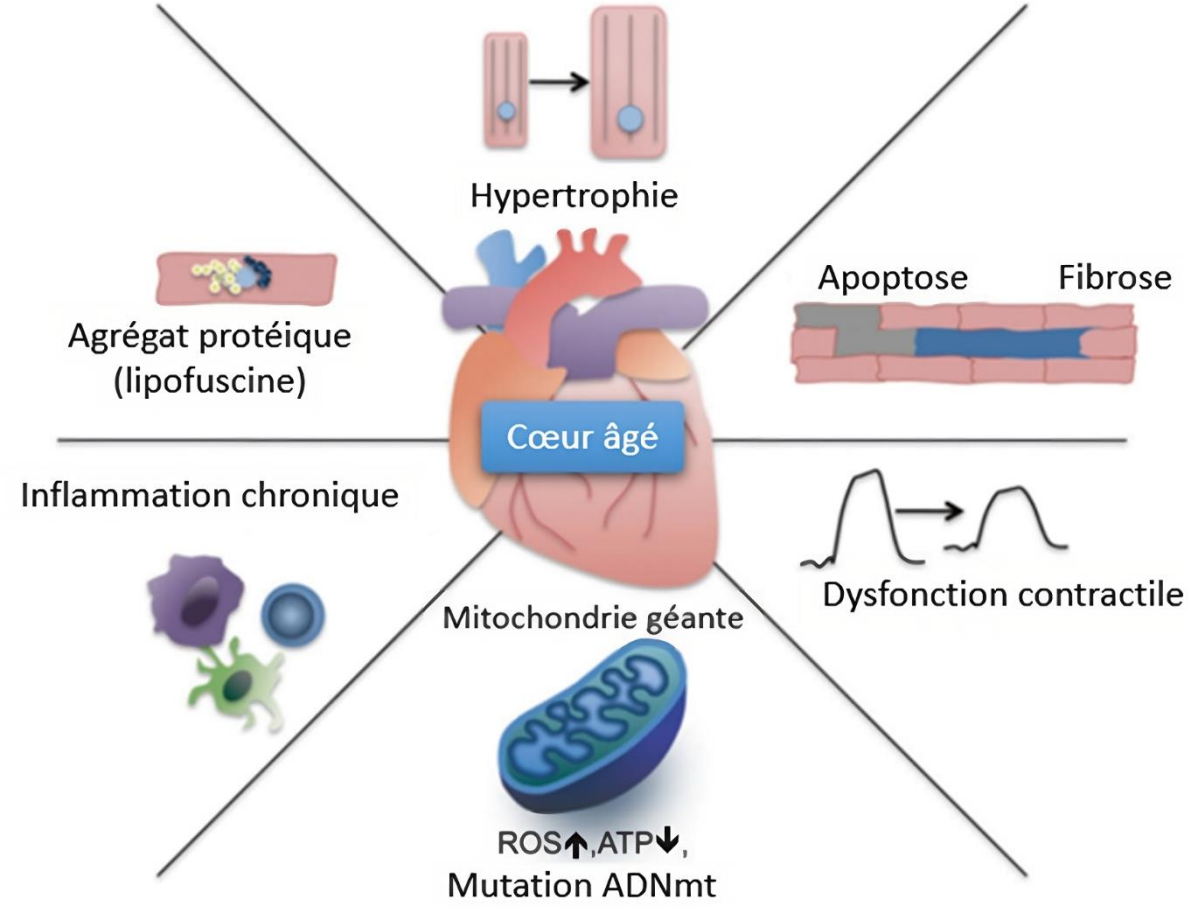


Figure 43 : Changements phénotypiques liés à l'âge dans le tissu cardiaque

Adapté de Miyamoto *et al.*, 2019.

décennies que le vieillissement est un facteur de risque majeur de ces pathologies, une étude menée par *Lok et Lau* en 1996 montrait déjà que la prévalence des arythmies cardiaques doublait entre les personnes âgées de 65 ans (8 %) et celles âgées de plus de 75 ans (16 %).[266] En parallèle, l'hyperplasie cellulaire compense une perte continue de CM, la fibrose et la perturbation de la régulation intracellulaire du Ca^{2+} y étant corrélées.[267]

1.9. Implication des mitochondries dans le vieillissement pathologique cardiaque

Les liens entre dysfonction mitochondriale et vieillissement cardiaque sont abondamment décrits dans la littérature, et de nombreux modèles de souris transgéniques ont permis de mieux en comprendre les mécanismes physiopathologiques. Nous avons donc réalisé une revue de cette thématique, avec un focus particulier sur l'implication de la dynamique mitochondriale et des mutations de l'ADNmt, qui a été soumise pour publication dans la revue *Aging Research Reviews*. Cette revue est présentée dans les pages suivantes.

Manuscrit de revue bibliographique soumis :

Heart of the matter: mitochondrial dynamics and genome alterations in cardiac aging

Heart of the matter: mitochondrial dynamics and genome alterations in cardiac aging

Claudie Gabillard-Lefort[1*], Théophile Thibault[1*], Guy Lenaers[1,2], Rudolf J. Wiesner[3,4,5], Jeanne Mialet-Perez[1] and Olivier R. Baris[1#]

[1]University of Angers, MitoLab, Unité MITOVASC, UMR CNRS 6015, INSERM U1083, SFR ICAT, Angers, France

[2]Department of Neurology, University Hospital of Angers, Angers, France.

[3]Center for Physiology and Pathophysiology, Institute of Systems Physiology, University of Cologne, Cologne, Germany

[4]Center for Molecular Medicine Cologne (CMMC), University of Cologne, Cologne, Germany

[5]Cologne Excellence Cluster on Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), University of Cologne, Cologne, Germany.

* = equal contribution

= corresponding author

Abstract

Cardiac pathological aging is a serious health issue, with cardiovascular diseases still being a leading cause of deaths worldwide. Therefore, there is an urgent need to identify culprit factors involved in this process. In the last decades, mitochondria, which are crucial for cardiac function, have emerged as major contributors. Mitochondria are organelles involved in a plethora of metabolic pathways and cell processes ranging from ATP production to calcium homeostasis or regulation of apoptotic pathways. This review provides a general overview of the pathomechanisms involving mitochondria during cardiac aging, with a focus on the role of mitochondrial dynamics and mitochondrial DNA (mtDNA). These mechanisms involve imbalanced mitochondrial fusion and fission, loss of mtDNA integrity leading to tissue mosaic of mitochondrial deficiency, as well as mtDNA release in the cytoplasm, promoting inflammation via the NLRP3, cGAS/STING and TLR9 pathways. Potential links between mtDNA, mitochondrial damage and cardiac senescence are also discussed. A better understanding of how these factors impact on heart function and accelerate its pathological aging should lead to the development of new therapies to promote healthy aging and restore age-induced cardiac dysfunction.

Keywords

Aging; Cardiovascular diseases; mtDNA; Mitochondria; Inflammation; Senescence; Mitochondrial dynamics

Funding

CGL, RJW and ORB were funded by ANR-20-CE92-0020. TT was funded by University of Angers and Région Pays de la Loire. JMP was funded by ANR-19-CE14-0038-01, Fédération Française de Cardiologie (FFC), Région Pays de la Loire.

1. Cardiac aging: why do mitochondria matter?

Aging is a major risk factor of cardiovascular diseases, with approximately 20% of people aged over 80 years at risk of developing heart failure (Mozzafarian et al., 2016), which is a major health issue in developed countries given the increased lifespan. Structural and functional changes occur in aging heart, such as hypertrophy, fibrosis and increased stiffness, ultimately leading to an increased incidence of heart failure, ventricular arrhythmias and other cardiomyopathies (Lazzeroni et al., 2022; Liu et al., 2021). Cardiac aging is also characterized by left ventricular wall thickness that gradually affects overall contractile efficiency, as well as an increase in elastic and collagenous tissue associated with inflammation, even in the absence of major cardiovascular risks (Izzo et al., 2018; Peverill, 2021). In contrast with neonatal heart, adult myocardial tissue has a low capacity for repair after injury, implying that the progressive decline in regenerative potential does not compensate for the progressive aging-driven cardiomyocyte loss (Lewis-McDougall et al., 2019; Li et al., 2019). During cardiac aging, cardiomyocytes display increased size and volume, dysfunctional organelles, protein misfolding and accumulation of damaged proteins, ultimately leading to oxidative stress, decreased maintenance of cellular quality control mechanisms and ultimately cell death (Gude et al., 2018; Kolwicz et al., 2013).

Studies from the last decades have supported the culprit relevance of mitochondrial dysfunction in the development of aging-related cardiac diseases, which is not surprising, since the heart strongly relies on mitochondrial energy production (reviewed in Bonora et al., 2019). Mitochondria are intracellular organelles occupying ~30% of the cardiomyocyte volume that play an essential role in cell metabolism by producing the major amount of Adenosine-TriPhosphate (ATP) using the oxidative phosphorylation system which couples electron flow through the respiratory chain to the ATP synthase (Barth et al., 1992; Brown et al., 2017). They are also essential for lipid synthesis from carbohydrates, biosynthesis of amino acids and nucleotides and calcium homeostasis, and are key regulators of cardiomyocyte survival (da Cunha et al., 2015; Kaniak-Golik and Skoneczna, 2015). During cardiac aging, many structural, and functional changes have been documented in mitochondria including fragmentation, swelling, imbalance of mitochondrial populations (intermyofibrillar versus subsarcolemmal), decreased cardiolipin content in the inner membrane changing membrane fluidity, increased ROS production and decreased OXPHOS activity (reviewed in Xie et al., 2023). Thus, given the importance of mitochondrial energetics in the heart, maintenance of mitochondrial integrity and functions is crucial for preventing cardiovascular and metabolic diseases.

2. Mitochondrial dynamics: network disturbances in the aged heart?

Mitochondrial homeostasis is maintained through the regulation of two opposing mechanisms: generation of new mitochondria by biogenesis and removal of damaged mitochondria by mitophagy and related processes (Ploumi et al., 2017). Both processes constantly adapt in response to cellular energy demand, developmental signals and environmental stimuli to maintain an equilibrium. During aging, the impairment of mitochondrial biogenesis is associated with decreased mitophagy, leading to an imbalance between new and damaged mitochondria, and consequently to a disturbed bioenergetic

potential. Moreover, mitochondria are organized in a dynamic intracellular network that constantly adapts to cell needs via mitochondrial fusion and fission (Wai and Langer, 2016). Several large GTPases have already been identified as key players in mitochondrial dynamics, such as optic atrophy 1 (OPA1) (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000) and mitofusin 1/2 (MFN1/2) (Santel and Fuller, 2001) for fusion, and dynamin-related protein 1 (DRP1) (Shin et al., 1997) for fission. This dynamism of the network is essential for mitochondrial quality control and especially for the maintenance of mitochondrial DNA (mtDNA) integrity, which encodes thirteen essential respiratory chain subunits, as fission facilitates the elimination of defective organelles via mitophagy (Slavin et al., 2022).

In vivo studies in mouse models with altered expression or ablation of fission or fusion proteins revealed that imbalanced mitochondrial dynamics is critical for cardiac function (Maneechote et al., 2024). Heart-specific ablation of fusion proteins MFN1/2 or fission proteins DRP1 and the mitochondrial fission factor MFF all resulted in cardiomyopathy, a pathological condition that could be mitigated by concomitant knockout of a gene involved in the opposite process, thus rebalancing mitochondrial dynamics (Chen et al., 2015; Song et al., 2017). Moreover, haploinsufficiency in OPA1 protein leads to late onset cardiomyopathy in mice (Chen et al., 2012), as well as increased sensitivity to ischemia/reperfusion injuries (Le Page et al., 2016), and imbalanced OPA1 processing in the heart leads to mitochondrial fragmentation, dilated cardiomyopathy and heart failure (Wai et al., 2015). In contrast, haploinsufficiency in DRP1 is protective against ischemia/reperfusion injuries (Bouche et al., 2021).

During cardiac aging, dysregulation of mitochondrial dynamics causes progressive mitochondrial defects that expand until a critical threshold is surpassed impairing cardiac function (Picca et al., 2018). Despite the fact that conflicting observations have been made in the heart of aged rodents, with studies highlighting an increased mitochondrial fragmentation, while others describing exacerbated fusion leading to senescence (Chen et al., 2022; Maneechote et al., 2024), the common point is that the equilibrium between fusion and fission is not maintained anymore, thus contributing to pathological dysfunction/alterations.

3. Mitochondrial DNA (mtDNA) alterations: a driving force in cardiac aging?

Mitochondrial dysfunction observed during aging is also explained by a compromised mtDNA integrity. Mitochondrial DNA is a small multi-copy circular genome (Anderson et al., 1981), encoding 2 ribosomal RNAs, 22 transfer RNAs and 13 crucial subunits of the mitochondrial respiratory chain complexes. Therefore, mtDNA alterations, either point mutations or large-scale deletions, have critical consequences on mitochondrial and cardiac physiology. The common cardiac symptoms linked to mtDNA mutations are arrhythmias and other cardiomyopathies, with a high level of clinical heterogeneity, since patients with the same mutation can display different cardiac phenotypes, and the same cardiac manifestation can occur in patients with multiple variants in different mtDNA genes (Bates et al., 2012; Chinnery, 2015).

The cause for compromised mtDNA integrity during aging is still debated. The historical “free radical theory of aging” stipulates that reactive oxygen species (ROS) are involved in mtDNA mutations (Harman, 1956). Indeed, ROS gradually accumulate during aging, because of redox imbalance and impaired mitochondrial oxidative phosphorylation, leading to electron leakage from the respiratory complexes (Dai et al., 2012). ROS thus promote oxidative damage of mtDNA, increasing in an age-dependent manner, as well as alterations of mitochondrial morphology and increase of the Bax/Bcl-2 ratio, shifting the balance towards apoptosis (Giorgi et al., 2018). This theory has yet been challenged in recent years with several studies showing that base transversions following ROS-induced damage are not over-represented in mtDNA during aging (Kauppila and Stewart, 2015) and suggesting that mtDNA mutations are rather generated by replication errors that are amplified over life time (Picard et al., 2016; Sanchez-Contreras et al., 2023).

mtDNA exists in thousands of copies per cell, with mutated and wild-type molecules coexisting, a phenomenon known as heteroplasmy (Stewart and Chinnery, 2015). Thus, mitochondrial dysfunction occurs if the proportion of mutated mtDNA exceeds a critical threshold, leading to the presence of defective cells among normal ones, a hallmark of tissue aging (Larsson, 2010). In humans, this mosaic pattern of mitochondrial deficiency was observed first in heart and skeletal muscle tissues (Müller-Höcker, 1990, 1989) and visualized via cytochrome c oxidase/succinate dehydrogenase staining (Sciacco and Bonilla, 1996), which stains normal cells in brown (COX-positive cells) and defective cells in blue (COX-negative cells). In muscle, such COX-negative cells and mtDNA deletions have been suggested to be a driving force of sarcopenia, the age-related loss of muscle mass (Herbst et al., 2016; Kimoloi et al., 2022). Cardiac arrhythmias were reported in patients suffering from diseases caused by massive accumulation of mtDNA deletions, such as Kearns-Sayre syndrome (KSS) or progressive external ophtalmoplegia (PEO) (Maceluch and Niedziela, 2006; Van Goethem et al., 2003), with high proportions of COX-negative cardiac cells. In contrast, in the aged human heart, COX-negative cells are of low abundance (0.5% at around age 70), and their pathophysiological role is unclear. Nonetheless, heart function, which shows a clear age-related increase in the incidence of cardiac disorders (Lok and Lau, 1996; Tresch and Thakur, 1998), could be impaired even by the presence of few dysfunctional cells, especially proper conduction of action potentials.

Genetically engineered mouse models mimicking the accumulation of mtDNA alterations helped in further delineating the detrimental role of COX- cells in the heart during aging. The mito-mouse (Inoue et al., 2000), harboring a 4696-bp mtDNA deletion leading to COX deficiency in many tissues, shows altered cardiac function with elongated PQ intervals and atrioventricular blocks (Nakada et al., 2001), although only at a very high proportion of COX-negative cardiomyocytes, thus not mimicking what is observed in aged human hearts. In contrast, three other mouse models illustrated that even low proportions of COX-negative cells can be detrimental for the heart. The mtDNA mutator mouse (Trifunovic et al., 2004), accumulating mtDNA point mutations due to a defective proofreading function of the mitochondrial DNA polymerase, was shown to develop cardiomyopathy with heart hypertrophy and dilatation, as well as impairment of systolic and diastolic functions (Dai et al., 2010). Another model harboring a single pathogenic mtDNA point mutation at various heteroplasmy levels, the C5024T tRNAAla mouse, also displays a cardiomyopathy with increased heart mass, paralleling the

presence of few COX-negative cardiomyocytes (Filograna et al., 2019; Kauppila et al., 2016). Last, the K320E-TwinkleMyo mouse, which expresses a pathogenic variant of the mtDNA helicase TWINKLE in the heart, mimic the age-dependent accumulation of mtDNA deletions and COX-negative cardiomyocytes observed in aged humans, responsible for cardiac arrhythmias including ventricular premature contractions and atrioventricular blocks (Baris et al., 2015). Altogether, these 3 mouse models highlight the critical role of mtDNA mutations in cardiac aging.

4. Inflammation in the aged heart: a role for mtDNA?

“Inflammaging” is a new concept of the aging process characterized by low-grade, sterile inflammation, which persists over time and progressively causes tissue damage (Franceschi et al., 2018). Inflammaging has been associated with mitochondrial dysfunction and increased extracellular release of mtDNA (Picca et al., 2022). Indeed, mtDNA contains unmethylated immunogenic CpG motifs that trigger inflammation through activation of Toll-Like Receptor-9 (TLR9) (Ries et al., 2013; Yamazoe et al., 2021). TLR9 is expressed in cardiomyocytes and activates the adaptor myeloid differentiation primary response protein 88 (MyD88)/mitogen-activated protein kinases (MAPKs)/NF-κB pathway (Bliksøen et al., 2016). High levels of circulating mtDNA have been associated with the development of cardiovascular diseases, including atherosclerosis, hypertension, acute myocardial infarction and heart failure, by triggering the TLR9-dependent inflammatory pathway (McCarthy et al., 2015; Oka et al., 2012; Wang et al., 2015). Among other receptors activated by the mtDNA, the nucleotide-binding domain (NOD)-like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome complex consists of a C-terminal leucine-rich repeat (LRR) domain, a central NOD domain with ATPase activity and a N-terminal pyrin domain (PYD), which interacts with the pyrin domain of apoptosis speck protein (ASC) to initiate inflammasome assembly (Kelley et al., 2019; Sandall et al., 2020; Xian et al., 2022). Ultimately, the NLRP3 inflammasome provides the signal for cleavage of pro-caspase-1 to active caspase-1, which processes the final maturation of pro-Interleukin (IL)-1β and pro-IL-18 to active IL-1β and IL-18. Caspase-1 cleavage by NLRP3 induces IL-1β secretion from immune cells and cardiac fibroblasts, contributing to cardiac inflammation and damage, following myocardial ischemia/reperfusion (Sandanger et al., 2013). Enhanced NLRP3 expression in cardiomyocytes was also demonstrated to be involved in atrial fibrillation (Yao et al., 2018). Some studies have assessed the impact of NLRP3 inflammasome during cardiac aging, revealing that inhibition of NLRP3 preserves cardiac function in aged mice (Marín-Aguilar et al., 2020) and ROS-mediated activation of NLRP3 inflammasome contributes to the pathogenesis of cardiomyocyte aging (Liao et al., 2021). Interestingly, cytosolic mtDNA release caused by increased mitochondrial ROS production promotes inflammatory response in cardiomyocytes in a NLRP3-dependent manner, leading to myocardial hypertrophy during the progression of diabetic cardiomyopathy (Yan et al., 2022). Cytosolic mtDNA also activates the cyclic GMP–AMP synthase (cGAS) / STimulator of INterferons Genes (STING) pathway, which promotes the transcription of interferon (IFN) genes and the activation of Nuclear Factor-κB (NF-κB) to boost the inflammatory process (Kim et al., 2023). Upregulation of the

cGAS/STING pathway was recently demonstrated in heart lysates from normal aged mice, contributing to age-associated inflammation (Gao et al., 2024).

5. Mitochondrial damage, mtDNA and senescence: is there a causal link?

These innate immune responses are activated not only in aging but also in cell senescence. Senescence is a deep remodeling of the cell phenotype, with increased expression of cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKi), cell enlargement, lysosomal expansion and the release of the senescence-associated secretory phenotype (SASP) composed of cytokines, chemokines, proteases and growth factors (Tchkonia et al., 2013). The SASP promotes bystander senescence of surrounding cells and participates in low-grade chronic inflammation (Tchkonia et al., 2013; Xu et al., 2018). In the heart, different cardiac cell types can undergo senescence with aging (Mehdizadeh et al., 2022) including cardiomyocytes that display persistent telomeric damage favored by mitochondrial dysfunction (Anderson et al., 2019). Removal of senescent cells by senolysis in aged mice reduced cardiac hypertrophy and fibrosis, two main deleterious features of cardiac aging (Anderson et al., 2019) and improved left ventricular remodeling, following ischemia-reperfusion (Dookun et al., 2020).

Dramatic changes in mitochondrial mass, dynamics and function are characteristics of senescent cells (Martini and Passos, 2023). Interestingly, clearance of mitochondria in fibroblasts or even total depletion of mtDNA (Rho0 osteosarcoma cells) prevented some pro-oxidant features of senescence and potently inhibited SASP secretion in response to irradiation, without any effect on proliferation (Correia-Melo et al., 2016). The link between mitochondria and SASP is therefore intriguing and could involve different mechanisms such as ROS production, mTOR or AMPK activation, and decreased NAD+/NADH ratio (Wiley et al., 2016). However, whether mtDNA plays a role in senescence and SASP remains unclear. The analysis of the PolG mutator mouse, which rapidly accumulates mtDNA point mutations, demonstrated a specific type of senescence with a distinct secretory profile in adipose tissue (Wiley et al., 2016). Also, Victorelli et al. demonstrated that senescent cells release mtDNA through the Bax/Bak macropore and stimulate the SASP through the activation of the cGAS/STING and type 1 IFN pathways (Victorelli et al., 2023). The majority of the released mtDNA co-localized with TFAM, a core component of the mtDNA nucleoids, and TFAM-mediated autophagic removal of cytoplasmic mtDNA did restrict inflammation (Liu et al., 2024; Victorelli et al., 2023). Mitochondrial dynamics also plays an important role in the regulation of the SASP/senescence pathway, as mitochondrial hyperfusion in senescent cells prevents mtDNA cytoplasmic release. In this respect, Mfn2 knock-down, inducing mitochondrial fragmentation, exacerbated the release of SASP factors without any effect on CDKi expression (Victorelli et al., 2023). At present, whether such pathways are operating in cardiac aging will require further investigations.

6. Conclusions

With cardiovascular diseases being a leading cause of deaths worldwide, there is an urgent need to identify factors responsible for the pathological aging process of the heart. In the last two decades,

mitochondria have emerged as major contributors of this process (Figure 1), since age-related changes in mitochondrial function, dynamics and quality control mechanisms were demonstrated to contribute significantly to the decline in cardiac functions in animal models. Mounting evidence points to a critical role of mtDNA, via the accumulation of age-induced alterations, and its propensity to trigger inflammation when released into the cytoplasm. Future research is needed to determine whether it also influences the development of senescence in cardiomyocytes, thus amplifying cardiac aging. Nevertheless, mitochondria represent a target of choice for the development of new therapies to promote healthy aging and restore age-induced cardiac dysfunction.

Declaration of interest

The autors have no conflicts of interest

Declaration of generative AI in scientific writing

No AI-generative tools have been used by the authors for writing this review

References

Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E.A., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., Bhattacharya, S.S., Wissinger, B., 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. Nat. Genet. 26, 211–215. https://doi.org/10.1038/79944

Anderson, R., Lagnado, A., Maggiorani, D., Walaszczyk, A., Dookun, E., Chapman, J., Birch, J., Salmonowicz, H., Ogrodnik, M., Jurk, D., Proctor, C., Correia-Melo, C., Victorelli, S., Fielder, E., Berlinguer-Palmini, R., Owens, A., Greaves, L.C., Kolsky, K.L., Parini, A., Douin-Echinard, V., LeBrasseur, N.K., Arthur, H.M., Tual-Chalot, S., Schafer, M.J., Roos, C.M., Miller, J.D., Robertson, N., Mann, J., Adams, P.D., Tchkonia, T., Kirkland, J.L., Mialet-Perez, J., Richardson, G.D., Passos, J.F., 2019. Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence. EMBO J. 38, e100492. https://doi.org/10.15252/embj.2018100492

Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R., Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature 290, 457–465. https://doi.org/10.1038/290457a0

Baris, O.R., Ederer, S., Neuhaus, J.F.G., von Kleist-Retzow, J.-C., Wunderlich, C.M., Pal, M., Wunderlich, F.T., Peeva, V., Zsurka, G., Kunz, W.S., Hickethier, T., Bunck, A.C., Stöckigt, F., Schrickel, J.W., Wiesner, R.J., 2015. Mosaic Deficiency in Mitochondrial Oxidative Metabolism

Promotes Cardiac Arrhythmia during Aging. Cell Metab. 21, 667–677. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.04.005

Barth, E., Stämmler, G., Speiser, B., Schaper, J., 1992. Ultrastructural quantitation of mitochondria and myofilaments in cardiac muscle from 10 different animal species including man. J. Mol. Cell. Cardiol. 24, 669–681. https://doi.org/10.1016/0022-2828(92)93381-s

Bates, M.G.D., Bourke, J.P., Giordano, C., d'Amati, G., Turnbull, D.M., Taylor, R.W., 2012. Cardiac involvement in mitochondrial DNA disease: clinical spectrum, diagnosis, and management. Eur. Heart J. 33, 3023–3033. https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehs275

Bliksøen, M., Mariero, L.H., Torp, M.K., Baysa, A., Ytrehus, K., Haugen, F., Seljeflot, I., Vaage, J., Valen, G., Stensløkken, K.-O., 2016. Extracellular mtDNA activates NF-κB via toll-like receptor 9 and induces cell death in cardiomyocytes. Basic Res. Cardiol. 111, 42. https://doi.org/10.1007/s00395-016-0553-6

Bonora, M., Wieckowski, M.R., Sinclair, D.A., Kroemer, G., Pinton, P., Galluzzi, L., 2019. Targeting mitochondria for cardiovascular disorders: therapeutic potential and obstacles. Nat. Rev. Cardiol. 16, 33–55. https://doi.org/10.1038/s41569-018-0074-0

Bouche, L., Kamel, R., Tamareille, S., Garcia, G., Villedieu, C., Pillot, B., Gueguen, N., Chehaitly, A., Chao de la Barca, J.M., Beaumont, J., Baetz, D., Ovize, M., Sesaki, H., Henrion, D., Reynier, P., Lenaers, G., Prunier, F., Mirebeau-Prunier, D., 2021. DRP1 haploinsufficiency attenuates cardiac ischemia/reperfusion injuries. PloS One 16, e0248554. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0248554

Brown, D.A., Perry, J.B., Allen, M.E., Sabbah, H.N., Stauffer, B.L., Shaikh, S.R., Cleland, J.G.F., Colucci, W.S., Butler, J., Voors, A.A., Anker, S.D., Pitt, B., Pieske, B., Filippatos, G., Greene, S.J., Gheorghiade, M., 2017. Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure. Nat. Rev. Cardiol. 14, 238–250. https://doi.org/10.1038/nrcardio.2016.203

Chen, H., Ren, S., Clish, C., Jain, M., Mootha, V., McCaffery, J.M., Chan, D.C., 2015. Titration of mitochondrial fusion rescues Mff-deficient cardiomyopathy. J. Cell Biol. 211, 795–805. https://doi.org/10.1083/jcb.201507035

Chen, J., Wu, X., Wang, Yanyi, Pan, Y., Ren, Y., Nakabeppu, Y., Fan, Y., Wang, Yaping, 2022. Mutyh deficiency downregulates mitochondrial fusion proteins and causes cardiac dysfunction via α-ketoglutaric acid reduction with oxidative stress. Free Radic. Res. 56, 129–142. https://doi.org/10.1080/10715762.2022.2036336

Chen, L., Liu, T., Tran, A., Lu, X., Tomilov, A.A., Davies, V., Cortopassi, G., Chiamvimonvat, N., Bers, D.M., Votruba, M., Knowlton, A.A., 2012. OPA1 mutation and late-onset cardiomyopathy: mitochondrial dysfunction and mtDNA instability. J. Am. Heart Assoc. 1, e003012. https://doi.org/10.1161/JAHA.112.003012

Chinnery, P.F., 2015. Mitochondrial disease in adults: what's old and what's new? EMBO Mol. Med. 7, 1503–1512. https://doi.org/10.15252/emmm.201505079

Correia-Melo, C., Marques, F.D.M., Anderson, R., Hewitt, G., Hewitt, R., Cole, J., Carroll, B.M., Miwa, S., Birch, J., Merz, A., Rushton, M.D., Charles, M., Jurk, D., Tait, S.W.G., Czapiewski, R., Greaves, L., Nelson, G., Bohlooly-Y, M., Rodriguez-Cuenca, S., Vidal-Puig, A., Mann, D., Saretzki, G., Quarato, G., Green, D.R., Adams, P.D., von Zglinicki, T., Korolchuk, V.I., Passos, J.F., 2016. Mitochondria are required for pro-ageing features of the senescent phenotype. EMBO J. 35, 724–742. https://doi.org/10.15252/embj.201592862

da Cunha, F.M., Torelli, N.Q., Kowaltowski, A.J., 2015. Mitochondrial Retrograde Signaling: Triggers, Pathways, and Outcomes. Oxid. Med. Cell. Longev. 2015, 482582. https://doi.org/10.1155/2015/482582

Dai, D.-F., Chen, T., Wanagat, J., Laflamme, M., Marcinek, D.J., Emond, M.J., Ngo, C.P., Prolla, T.A., Rabinovitch, P.S., 2010. Age-dependent cardiomyopathy in mitochondrial mutator mice is attenuated by overexpression of catalase targeted to mitochondria. Aging Cell 9, 536–544. https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2010.00581.x

Dai, D.-F., Rabinovitch, P.S., Ungvari, Z., 2012. Mitochondria and Cardiovascular Aging. Circ. Res. 110, 1109–1124. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.111.246140

Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.-M., 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, C.P., 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. Nat. Genet. 26, 207–210. https://doi.org/10.1038/79936

Dookun, E., Walaszczyk, A., Redgrave, R., Palmowski, P., Tual-Chalot, S., Suwana, A., Chapman, J., Jirkovsky, E., Donastorg Sosa, L., Gill, E., Yausep, O.E., Santin, Y., Mialet-Perez, J., Andrew Owens, W., Grieve, D., Spyridopoulos, I., Taggart, M., Arthur, H.M., Passos, J.F., Richardson, G.D., 2020. Clearance of senescent cells during cardiac ischemia-reperfusion injury improves recovery. Aging Cell 19, e13249. https://doi.org/10.1111/acel.13249

Filograna, R., Koolmeister, C., Upadhyay, M., Pajak, A., Clemente, P., Wibom, R., Simard, M.L., Wredenberg, A., Freyer, C., Stewart, J.B., Larsson, N.G., 2019. Modulation of mtDNA copy number ameliorates the pathological consequences of a heteroplasmic mtDNA mutation in the mouse. Sci. Adv. 5, eaav9824. https://doi.org/10.1126/sciadv.aav9824

Franceschi, C., Zaikin, A., Gordleeva, S., Ivanchenko, M., Bonifazi, F., Storci, G., Bonafè, M., 2018. Inflammaging 2018: An update and a model. Semin. Immunol., Inflammaging 40, 1–5. https://doi.org/10.1016/j.smim.2018.10.008

Gao, D., Zhao, B., Yu, J., Li, X., Yang, D., Luo, Y., Xia, Y., Cai, X., Guo, Y., 2024. Deletion of stimulator of interferons genes aggravated cardiac dysfunction in physiological aged mice. Mech. Ageing Dev. 222, 111978. https://doi.org/10.1016/j.mad.2024.111978

Giorgi, C., Marchi, S., Simoes, I.C.M., Ren, Z., Morciano, G., Perrone, M., Patalas-Krawczyk, P., Borchard, S., Jędrak, P., Pierzynowska, K., Szymański, J., Wang, D.Q., Portincasa, P., Węgrzyn, G.,

Zischka, H., Dobrzyn, P., Bonora, M., Duszynski, J., Rimessi, A., Karkucinska-Wieckowska, A., Dobrzyn, A., Szabadkai, G., Zavan, B., Oliveira, P.J., Sardao, V.A., Pinton, P., Wieckowski, M.R., 2018. Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. Int. Rev. Cell Mol. Biol. 340, 209–344. https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.006

Gude, N.A., Broughton, K.M., Firouzi, F., Sussman, M.A., 2018. Cardiac ageing: extrinsic and intrinsic factors in cellular renewal and senescence. Nat. Rev. Cardiol. 15, 523–542. https://doi.org/10.1038/s41569-018-0061-5

Harman, D., 1956. Aging: A Theory Based on Free Radical and Radiation Chemistry. J. Gerontol. 11, 298–300. https://doi.org/10.1093/geronj/11.3.298

Herbst, A., Wanagat, J., Cheema, N., Widjaja, K., McKenzie, D., Aiken, J.M., 2016. Latent mitochondrial DNA deletion mutations drive muscle fiber loss at old age. Aging Cell 15, 1132–1139. https://doi.org/10.1111/acel.12520

Inoue, K., Nakada, K., Ogura, A., Isobe, K., Goto, Y., Nonaka, I., Hayashi, J.I., 2000. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. Nat. Genet. 26, 176–181. https://doi.org/10.1038/82826

Izzo, C., Carrizzo, A., Alfano, A., Virtuoso, N., Capunzo, M., Calabrese, M., De Simone, E., Sciarretta, S., Frati, G., Oliveti, M., Damato, A., Ambrosio, M., De Caro, F., Remondelli, P., Vecchione, C., 2018. The Impact of Aging on Cardio and Cerebrovascular Diseases. Int. J. Mol. Sci. 19, 481. https://doi.org/10.3390/ijms19020481

Kaniak-Golik, A., Skoneczna, A., 2015. Mitochondria-nucleus network for genome stability. Free Radic. Biol. Med. 82, 73–104. https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2015.01.013

Kauppila, J.H.K., Baines, H.L., Bratic, A., Simard, M.-L., Freyer, C., Mourier, A., Stamp, C., Filograna, R., Larsson, N.-G., Greaves, L.C., Stewart, J.B., 2016. A Phenotype-Driven Approach to Generate Mouse Models with Pathogenic mtDNA Mutations Causing Mitochondrial Disease. Cell Rep. 16, 2980–2990. https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.08.037

Kauppila, J.H.K., Stewart, J.B., 2015. Mitochondrial DNA: Radically free of free-radical driven mutations. Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg. 1847, 1354–1361. https://doi.org/10.1016/j.bbabio.2015.06.001

Kelley, N., Jeltema, D., Duan, Y., He, Y., 2019. The NLRP3 Inflammasome: An Overview of Mechanisms of Activation and Regulation. Int. J. Mol. Sci. 20, 3328. https://doi.org/10.3390/ijms20133328

Kim, J., Kim, H.-S., Chung, J.H., 2023. Molecular mechanisms of mitochondrial DNA release and activation of the cGAS-STING pathway. Exp. Mol. Med. 55, 510–519. https://doi.org/10.1038/s12276-023-00965-7

Kimoloi, S., Sen, A., Guenther, S., Braun, T., Brügmann, T., Sasse, P., Wiesner, R.J., Pla-Martín, D., Baris, O.R., 2022. Combined fibre atrophy and decreased muscle regeneration capacity driven by

mitochondrial DNA alterations underlie the development of sarcopenia. J. Cachexia Sarcopenia Muscle 13, 2132–2145. https://doi.org/10.1002/jcsm.13026

Kolwicz, S.C., Purohit, S., Tian, R., 2013. Cardiac Metabolism and its Interactions With Contraction, Growth, and Survival of Cardiomyocytes. Circ. Res. 113, 603–616. https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.113.302095

Larsson, N.-G., 2010. Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging. Annu. Rev. Biochem. 79, 683–706. https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060408-093701

Lazzeroni, D., Villatore, A., Souryal, G., Pili, G., Peretto, G., 2022. The Aging Heart: A Molecular and Clinical Challenge. Int. J. Mol. Sci. 23, 16033. https://doi.org/10.3390/ijms232416033

Le Page, S., Niro, M., Fauconnier, J., Cellier, L., Tamareille, S., Gharib, A., Chevrollier, A., Loufrani, L., Grenier, C., Kamel, R., Sarzi, E., Lacampagne, A., Ovize, M., Henrion, D., Reynier, P., Lenaers, G., Mirebeau-Prunier, D., Prunier, F., 2016. Increase in Cardiac Ischemia-Reperfusion Injuries in Opa1+/- Mouse Model. PloS One 11, e0164066. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0164066

Lewis-McDougall, F.C., Ruchaya, P.J., Domenjo-Vila, E., Shin Teoh, T., Prata, L., Cottle, B.J., Clark, J.E., Punjabi, P.P., Awad, W., Torella, D., Tchkonia, T., Kirkland, J.L., Ellison-Hughes, G.M., 2019. Aged-senescent cells contribute to impaired heart regeneration. Aging Cell 18, e12931. https://doi.org/10.1111/acel.12931

Li, J., Yang, K.Y., Tam, R.C.Y., Chan, V.W., Lan, H.Y., Hori, S., Zhou, B., Lui, K.O., 2019. Regulatory T-cells regulate neonatal heart regeneration by potentiating cardiomyocyte proliferation in a paracrine manner. Theranostics 9, 4324–4341. https://doi.org/10.7150/thno.32734

Liao, L.-Z., Chen, Z.-C., Wang, S.-S., Liu, W.-B., Zhao, C.-L., Zhuang, X.-D., 2021. NLRP3 inflammasome activation contributes to the pathogenesis of cardiocytes aging. Aging 13, 20534–20551. https://doi.org/10.18632/aging.203435

Liu, C., Bai, J., Dan, Q., Yang, X., Lin, K., Fu, Z., Lu, X., Xie, X., Liu, J., Fan, L., Li, Y., 2021. Mitochondrial Dysfunction Contributes to Aging-Related Atrial Fibrillation. Oxid. Med. Cell. Longev. 2021, 5530293. https://doi.org/10.1155/2021/5530293

Liu, H., Zhen, C., Xie, J., Luo, Z., Zeng, L., Zhao, G., Lu, S., Zhuang, H., Fan, H., Li, X., Liu, Z., Lin, S., Jiang, H., Chen, Y., Cheng, J., Cao, Z., Dai, K., Shi, J., Wang, Z., Hu, Y., Meng, T., Zhou, C., Han, Z., Huang, H., Zhou, Q., He, P., Feng, D., 2024. TFAM is an autophagy receptor that limits inflammation by binding to cytoplasmic mitochondrial DNA. Nat. Cell Biol. 26, 878–891. https://doi.org/10.1038/s41556-024-01419-6

Lok, N.-S., Lau, C.-P., 1996. Prevalence of palpitations, cardiac arrhythmias and their associated risk factors in ambulant elderly. Int. J. Cardiol. 54, 231–236. https://doi.org/10.1016/0167-5273(96)02601-0

Maceluch, J.A., Niedziela, M., 2006. The clinical diagnosis and molecular genetics of kearns-sayre syndrome: a complex mitochondrial encephalomyopathy. Pediatr. Endocrinol. Rev. PER 4, 117–137.

Maneechote, C., Chattipakorn, S.C., Chattipakorn, N., 2024. Future perspectives on the roles of mitochondrial dynamics in the heart in obesity and aging. Life Sci. 344, 122575. https://doi.org/10.1016/j.lfs.2024.122575

Marín-Aguilar, F., Lechuga-Vieco, A.V., Alcocer-Gómez, E., Castejón-Vega, B., Lucas, J., Garrido, C., Peralta-Garcia, A., Pérez-Pulido, A.J., Varela-López, A., Quiles, J.L., Ryffel, B., Flores, I., Bullón, P., Ruiz-Cabello, J., Cordero, M.D., 2020. NLRP3 inflammasome suppression improves longevity and prevents cardiac aging in male mice. Aging Cell 19, e13050. https://doi.org/10.1111/acel.13050

Martini, H., Passos, J.F., 2023. Cellular senescence: all roads lead to mitochondria. FEBS J. 290, 1186–1202. https://doi.org/10.1111/febs.16361

McCarthy, C.G., Wenceslau, C.F., Goulopoulou, S., Ogbi, S., Baban, B., Sullivan, J.C., Matsumoto, T., Webb, R.C., 2015. Circulating mitochondrial DNA and Toll-like receptor 9 are associated with vascular dysfunction in spontaneously hypertensive rats. Cardiovasc. Res. 107, 119–130. https://doi.org/10.1093/cvr/cvv137

Mehdizadeh, M., Aguilar, M., Thorin, E., Ferbeyre, G., Nattel, S., 2022. The role of cellular senescence in cardiac disease: basic biology and clinical relevance. Nat. Rev. Cardiol. 19, 250–264. https://doi.org/10.1038/s41569-021-00624-2

Müller-Höcker, J., 1990. Cytochrome c oxidase deficient fibres in the limb muscle and diaphragm of man without muscular disease: An age-related alteration. J. Neurol. Sci. 100, 14–21. https://doi.org/10.1016/0022-510X(90)90006-9

Müller-Höcker, J., 1989. Cytochrome-c-oxidase deficient cardiomyocytes in the human heart--an age-related phenomenon. A histochemical ultracytochemical study. Am. J. Pathol. 134, 1167–1173.

Nakada, K., Inoue, K., Chen, C.S., Nonaka, I., Goto, Y., Ogura, A., Hayashi, J.I., 2001. Correlation of functional and ultrastructural abnormalities of mitochondria in mouse heart carrying a pathogenic mutant mtDNA with a 4696-bp deletion. Biochem. Biophys. Res. Commun. 288, 901–907. https://doi.org/10.1006/bbrc.2001.5873

Oka, T., Hikoso, S., Yamaguchi, O., Taneike, M., Takeda, T., Tamai, T., Oyabu, J., Murakawa, T., Nakayama, H., Nishida, K., Akira, S., Yamamoto, A., Komuro, I., Otsu, K., 2012. Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure. Nature 485, 251–255. https://doi.org/10.1038/nature10992

Peverill, R.E., 2021. Changes in left ventricular size, geometry, pump function and left heart pressures during healthy aging. Rev. Cardiovasc. Med. 22, 717–729. https://doi.org/10.31083/j.rcm2203079

Picard, M., Wallace, D.C., Burelle, Y., 2016. The rise of mitochondria in medicine. Mitochondrion 30, 105–116. https://doi.org/10.1016/j.mito.2016.07.003

Picca, A., Guerra, F., Calvani, R., Romano, R., Coelho-Junior, H.J., Damiano, F.P., Bucci, C., Marzetti, E., 2022. Circulating Mitochondrial DNA and Inter-Organelle Contact Sites in Aging and Associated Conditions. Cells 11, 675. https://doi.org/10.3390/cells11040675

Picca, A., Mankowski, R.T., Burman, J.L., Donisi, L., Kim, J.-S., Marzetti, E., Leeuwenburgh, C., 2018. Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in cardiac ageing. Nat. Rev. Cardiol. 15, 543–554. https://doi.org/10.1038/s41569-018-0059-z

Ploumi, C., Daskalaki, I., Tavernarakis, N., 2017. Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. FEBS J. 284, 183–195. https://doi.org/10.1111/febs.13820

Ries, M., Schuster, P., Thomann, S., Donhauser, N., Vollmer, J., Schmidt, B., 2013. Identification of novel oligonucleotides from mitochondrial DNA that spontaneously induce plasmacytoid dendritic cell activation. J. Leukoc. Biol. 94, 123–135. https://doi.org/10.1189/jlb.0612278

Sanchez-Contreras, M., Sweetwyne, M.T., Tsantilas, K.A., Whitson, J.A., Campbell, M.D., Kohrn, B.F., Kim, H.J., Hipp, M.J., Fredrickson, J., Nguyen, M.M., Hurley, J.B., Marcinek, D.J., Rabinovitch, P.S., Kennedy, S.R., 2023. The multi-tissue landscape of somatic mtDNA mutations indicates tissue-specific accumulation and removal in aging. eLife 12, e83395. https://doi.org/10.7554/eLife.83395

Sandall, C.F., Ziehr, B.K., MacDonald, J.A., 2020. ATP-Binding and Hydrolysis in Inflammasome Activation. Mol. Basel Switz. 25, 4572. https://doi.org/10.3390/molecules25194572

Sandanger, Ø., Ranheim, T., Vinge, L.E., Bliksøen, M., Alfsnes, K., Finsen, A.V., Dahl, C.P., Askevold, E.T., Florholmen, G., Christensen, G., Fitzgerald, K.A., Lien, E., Valen, G., Espevik, T., Aukrust, P., Yndestad, A., 2013. The NLRP3 inflammasome is up-regulated in cardiac fibroblasts and mediates myocardial ischaemia-reperfusion injury. Cardiovasc. Res. 99, 164–174. https://doi.org/10.1093/cvr/cvt091

Santel, A., Fuller, M.T., 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. J. Cell Sci. 114, 867–874. https://doi.org/10.1242/jcs.114.5.867

Sciacco, M., Bonilla, E., 1996. [43]Cytochemistry and immunocytochemistry of mitochondria in tissue sections, in: Methods in Enzymology. Elsevier, pp. 509–521. https://doi.org/10.1016/S0076-6879(96)64045-2

Shin, H.-W., Shinotsuka, C., Torii, S., Murakami, K., Nakayama, K., 1997. Identification and Subcellular Localization of a Novel Mammalian Dynamin-Related Protein Homologous to Yeast Vps1p and Dnm1p. J. Biochem. (Tokyo) 122, 525–530. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021784

Slavin, M.B., Memme, J.M., Oliveira, A.N., Moradi, N., Hood, D.A., 2022. Regulatory networks coordinating mitochondrial quality control in skeletal muscle. Am. J. Physiol. Cell Physiol. 322, C913–C926. https://doi.org/10.1152/ajpcell.00065.2022

Song, M., Franco, A., Fleischer, J.A., Zhang, L., Dorn, G.W., 2017. Abrogating Mitochondrial Dynamics in Mouse Hearts Accelerates Mitochondrial Senescence. Cell Metab. 26, 872-883.e5. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.09.023

Stewart, J.B., Chinnery, P.F., 2015. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. Nat. Rev. Genet. 16, 530–542. https://doi.org/10.1038/nrg3966

Tchkonia, T., Zhu, Y., van Deursen, J., Campisi, J., Kirkland, J.L., 2013. Cellular senescence and the senescent secretory phenotype: therapeutic opportunities. J. Clin. Invest. 123, 966–972. https://doi.org/10.1172/JCI64098

Tresch, D.D., Thakur, R.K., 1998. VENTRICULAR ARRHYTHMIAS IN THE ELDERLY. Emerg. Med. Clin. North Am. 16, 627–648. https://doi.org/10.1016/S0733-8627(05)70022-5

Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly-Y, M., Gidlöf, S., Oldfors, A., Wibom, R., Törnell, J., Jacobs, H.T., Larsson, N.-G., 2004. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. Nature 429, 417–423. https://doi.org/10.1038/nature02517

Van Goethem, G., Martin, J.-J., Van Broeckhoven, C., 2003. Progressive external ophthalmoplegia characterized by multiple deletions of mitochondrial DNA: unraveling the pathogenesis of human mitochondrial DNA instability and the initiation of a genetic classification. Neuromolecular Med. 3, 129–146. https://doi.org/10.1385/NMM:3:3:129

Victorelli, S., Salmonowicz, H., Chapman, J., Martini, H., Vizioli, M.G., Riley, J.S., Cloix, C., Hall-Younger, E., Machado Espindola-Netto, J., Jurk, D., Lagnado, A.B., Sales Gomez, L., Farr, J.N., Saul, D., Reed, R., Kelly, G., Eppard, M., Greaves, L.C., Dou, Z., Pirius, N., Szczepanowska, K., Porritt, R.A., Huang, H., Huang, T.Y., Mann, D.A., Masuda, C.A., Khosla, S., Dai, H., Kaufmann, S.H., Zacharioudakis, E., Gavathiotis, E., LeBrasseur, N.K., Lei, X., Sainz, A.G., Korolchuk, V.I., Adams, P.D., Shadel, G.S., Tait, S.W.G., Passos, J.F., 2023. Apoptotic stress causes mtDNA release during senescence and drives the SASP. Nature 622, 627–636. https://doi.org/10.1038/s41586-023-06621-4

Wai, T., García-Prieto, J., Baker, M.J., Merkwirth, C., Benit, P., Rustin, P., Rupérez, F.J., Barbas, C., Ibañez, B., Langer, T., 2015. Imbalanced OPA1 processing and mitochondrial fragmentation cause heart failure in mice. Science 350, aad0116. https://doi.org/10.1126/science.aad0116

Wai, T., Langer, T., 2016. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. Trends Endocrinol. Metab. 27, 105–117. https://doi.org/10.1016/j.tem.2015.12.001

Wang, Lei, Xie, L., Zhang, Q., Cai, X., Tang, Y., Wang, Lijun, Hang, T., Liu, J., Gong, J., 2015. Plasma nuclear and mitochondrial DNA levels in acute myocardial infarction patients. Coron. Artery Dis. 26, 296–300. https://doi.org/10.1097/MCA.0000000000000231

Wiley, C.D., Velarde, M.C., Lecot, P., Liu, S., Sarnoski, E.A., Freund, A., Shirakawa, K., Lim, H.W., Davis, S.S., Ramanathan, A., Gerencser, A.A., Verdin, E., Campisi, J., 2016. Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype. Cell Metab. 23, 303–314. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.11.011

Xian, H., Watari, K., Sanchez-Lopez, E., Offenberger, J., Onyuru, J., Sampath, H., Ying, W., Hoffman, H.M., Shadel, G.S., Karin, M., 2022. Oxidized DNA fragments exit mitochondria via mPTP- and VDAC-dependent channels to activate NLRP3 inflammasome and interferon signaling. Immunity 55, 1370-1385.e8. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2022.06.007

Xie, S., Xu, S.-C., Deng, W., Tang, Q., 2023. Metabolic landscape in cardiac aging: insights into molecular biology and therapeutic implications. Signal Transduct. Target. Ther. 8, 114. https://doi.org/10.1038/s41392-023-01378-8

Xu, M., Pirtskhalava, T., Farr, J.N., Weigand, B.M., Palmer, A.K., Weivoda, M.M., Inman, C.L., Ogrodnik, M.B., Hachfeld, C.M., Fraser, D.G., Onken, J.L., Johnson, K.O., Verzosa, G.C., Langhi, L.G.P., Weigl, M., Giorgadze, N., LeBrasseur, N.K., Miller, J.D., Jurk, D., Singh, R.J., Allison, D.B., Ejima, K., Hubbard, G.B., Ikeno, Y., Cubro, H., Garovic, V.D., Hou, X., Weroha, S.J., Robbins, P.D., Niedernhofer, L.J., Khosla, S., Tchkonia, T., Kirkland, J.L., 2018. Senolytics improve physical function and increase lifespan in old age. Nat. Med. 24, 1246–1256. https://doi.org/10.1038/s41591-018-0092-9

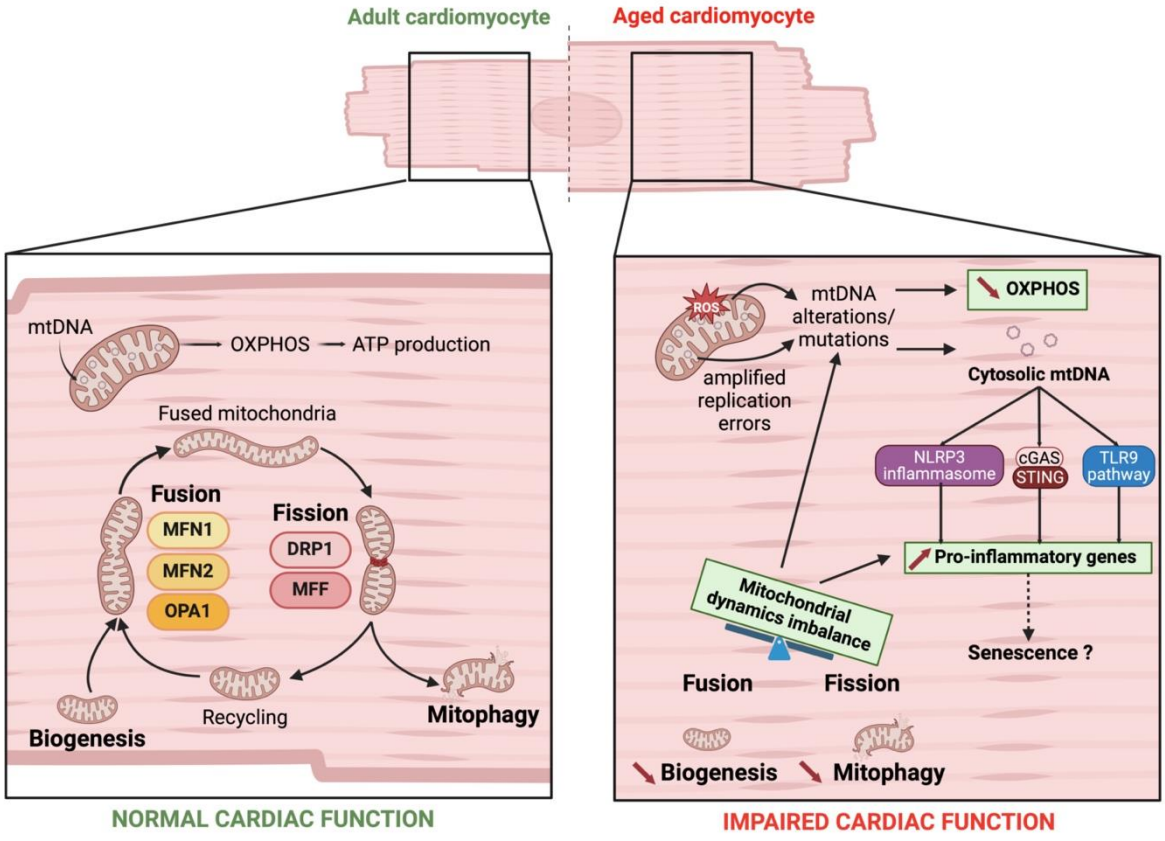
Yamazoe, M., Sasano, T., Ihara, K., Takahashi, K., Nakamura, W., Takahashi, N., Komuro, H., Hamada, S., Furukawa, T., 2021. Sparsely methylated mitochondrial cell free DNA released from cardiomyocytes contributes to systemic inflammatory response accompanied by atrial fibrillation. Sci. Rep. 11, 5837. https://doi.org/10.1038/s41598-021-85204-7

Yan, M., Li, Y., Luo, Q., Zeng, W., Shao, X., Li, L., Wang, Q., Wang, D., Zhang, Y., Diao, H., Rong, X., Bai, Y., Guo, J., 2022. Mitochondrial damage and activation of the cytosolic DNA sensor cGAS-STING pathway lead to cardiac pyroptosis and hypertrophy in diabetic cardiomyopathy mice. Cell Death Discov. 8, 258. https://doi.org/10.1038/s41420-022-01046-w

Yao, C., Veleva, T., Scott, L., Cao, S., Li, L., Chen, G., Jeyabal, P., Pan, X., Alsina, K.M., Abu-Taha, I., Ghezelbash, S., Reynolds, C.L., Shen, Y.H., LeMaire, S.A., Schmitz, W., Müller, F.U., El-Armouche, A., Tony Eissa, N., Beeton, C., Nattel, S., Wehrens, X.H.T., Dobrev, D., Li, N., 2018. Enhanced Cardiomyocyte NLRP3 Inflammasome Signaling Promotes Atrial Fibrillation. Circulation 138, 2227–2242. https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.118.035202

Figure Legend:

Figure 1: Imbalanced mitochondrial dynamics and loss of mtDNA integrity contribute to pathological cardiac aging. In adult cardiomyocytes, mitochondrial homeostasis requires a fine-tuned and adaptative balance between fusion, involving OPA1, MFN1 and MFN2 and fission, involving DRP1 and MFF, to either favor mitochondrial biogenesis or the elimination of dysfunctional organelles. Balanced mitochondrial dynamics also contributes to the maintenance of mtDNA to sustain ATP production by the OXPHOS system. During cardiac aging, regularly resulting in hypertrophic cardiomyocytes, imbalanced mitochondrial dynamics, elevated ROS production and amplified mtDNA replication errors contribute to mtDNA loss of integrity, directly impairing OXPHOS activity and thus ATP production. Cytosolic release of mtDNA triggers an increased expression of pro-inflammatory genes via the NLRP3 inflammasome, cGAS/Sting and TLR9 pathways. Imbalanced mitochondrial dynamics also contribute to this inflammatory response and leads to altered mitochondrial biogenesis and mitophagy. This mitochondria-driven inflammatory response is hypothesized to contribute to cardiomyocyte senescence, further aggravating heart dysfunction. Abbreviations: **OPA1**: optic atrophy 1; **MFN1/2**: mitofusin 1/2; **DRP1**: dynamin-related protein 1; **MFF**: mitochondrial fission factor; **mtDNA**: mitochondrial DNA; **OXPHOS**: oxidative phosphorylation; **ROS**: reactive oxygen species; **NLRP3**: NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3; **cGAS**: cyclic GMP-AMP synthase; **STING**: stimulator of interferon genes; **TLR9**: Toll-like receptor 9.



1.10. Objectifs du doctorat

1.10.1. Contexte

Les MCV étant encore aujourd'hui une des premières causes de décès dans le monde, et l'âge en étant un des principaux facteurs de risque, un objectif majeur de santé public est la découverte et la compréhension des mécanismes qui sous-tendent leur développement au cours du vieillissement. Un des principaux constats pouvant être effectué, après avoir consulté la littérature scientifique disponible à ce sujet, est que le vieillissement est plurifactoriel. Il résulte vraisemblablement d'atteintes génomiques au niveau de l'ADNmt et de l'ADN nucléaire, de l'accumulation de protéines dysfonctionnelles, de mécanismes de contrôles qualités défectueux qui entrainent l'accumulation de cellules dysfonctionnelles dans les tissus, que ce soient des cellules sénescentes ou cellules COX^- ayant perdu leur activité mitochondriale. De manière intéressante, ces cellules dysfonctionnelles sont en proportions relativement faibles dans les tissus âgés, mais leurs interactions et signalisation avec les cellules adjacentes pourrait engendrer un dysfonctionnement plus général, que cela soit par la sécrétion du SASP pour les cellules sénescentes ou bien de par leur métabolisme modifié pour les cellules COX^-.

1.10.2. Résultats antérieurs à l'étude : Modèle K320E-Twinkle^{Myo}

C'est pour étudier l'impact de cette faible proportion de cellules COX- sur la fonction d'un organe que le modèle K320E-Twinkle a été développé. Ces souris expriment une mutation de la protéine TWINKLE qui est impliquée dans le SANDO chez des patients (mutation K319 chez l'homme, K320E chez la souris) de manière tissu-spécifique par un système cre-lox. Cette mutation, la plus sévère identifiée pour TWINKLE, entraîne l'accumulation de délétions de l'ADNmt et le développement d'une mosaïque tissulaire mitochondriale. Le premier organe choisi pour étudier l'impact des cellules COX^- au cours du vieillissement a été le cœur, puisque cet organe présente des signes évidents de dysfonction au cours du vieillissement, comme nous l'avons vu dans les parties précédentes, et parce que l'amplification clonale de délétions[78] et la COX-déficience a été observée dans les cardiomyocytes de cœur humains âgés (**Figure 44**).[268]

Ce modèle, qui reproduit à l'âge de 18 mois la mosaïque mitochondriale observée dans le cœur d'un homme de 70 ans (0,5 % de cellules COX^-), a permis de montrer que l'accumulation de délétions de l'ADNmt âge-dépendante et celle de cardiomyocytes COX^-

qui s'en suit sont impliquées dans la pathogenèse d'arythmies ventriculaires de type CVP et BAV, sans causer de dysfonctionnement mitochondrial global dans le cœur, ni exacerber les signes classiques de vieillissement de ce tissu que sont la fibrose ou encore l'hypertrophie des cardiomyocytes.[269] Cet impact est soumis à un effet de seuil, puisqu'il n'était pas observé lorsque la proportion de cardiomyocytes COX^- dans le cœur est de 0,2 %, chez des souris de 12 mois.

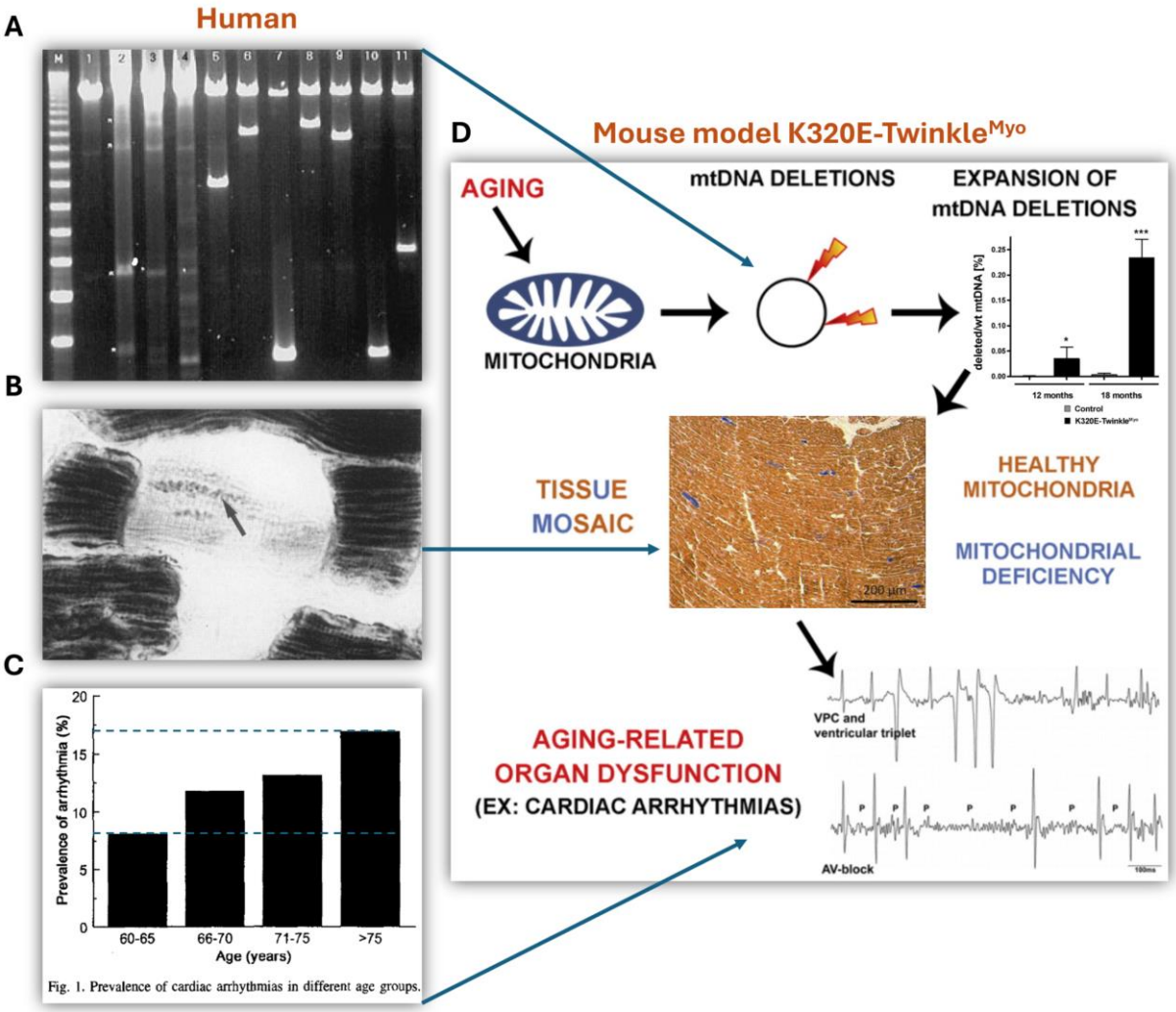


Figure 44 : Le modèle de souris K320E-Twinkle^{Myo} mime le phénotype cardiaque résultant du vieillissement humain

A) Des cardiomyocytes d'hommes très âgés contiennent de l'ADNmt ayant subi une expansion clonale de copies présentant des délétions. De Khrapko et al., 1999. **B)** Coupe de cœur d'un homme centenaire décédé, présentant une COX-déficience des cardiomyocytes mise en évidence par coloration COX/SDH. De Müller-Höcker, 1989.[65] **C)** Prévalence des arythmies cardiaques en fonction de la tranche d'âge. La prévalence double entre 65 et 75 ans. De Lok & Lau, 1996. **D)** Les mêmes caractéristiques cellulaires sont retrouvées chez le modèle d'étude souris K320E-Twinkle^{Myo}, qui accumule de larges délétions de l'ADNmt.[8] Barre d'échelle : 200 µm. Adapté de Baris et al., 2015.

1.10.3. Hypothèse et approche expérimentale

Le modèle a permis de montrer que les cellules COX^- observées dans le cœur au cours du vieillissement sont bel et bien impliquées dans les atteintes fonctionnelles de cet organe, et que tout comme il y a un effet de seuil critique d'hétéroplasmie de l'ADNmt pour causer une dysfonction mitochondriale, il y a un seuil critique de cellules COX^- à dépasser pour engendrer une atteinte fonctionnelle. Ainsi, nous proposons que toute intervention visant à ralentir l'accumulation de délétions de l'ADNmt, et par conséquent de cellules dysfonctionnelles dans les cœurs âgés pourrait retarder l'apparition de troubles fonctionnels cardiaques.

Nous avons choisi de **moduler deux mécanismes impliqués dans le contrôle qualité mitochondrial, la dynamique mitochondriale et la mitophagie (Figure 45),** par des approches génétiques et pharmacologiques chez les souris K320E-$Twinkle^{Myo}$ pour ensuite en voir l'impact sur 3 points critiques du processus de vieillissement cardiaque : le taux de copies d'ADNmt délétées, le taux de CM COX^- et bien sûr l'atteinte fonctionnelle de l'organe, les arythmies cardiaques.[266]

Le choix de challenger ces deux processus de contrôle qualité mitochondrial est basé sur des observations dans la littérature. Ainsi, il a été rapporté que les patients porteurs de mutations dans les gènes codant pour les protéines de fusion *OPA1* et *MFN2* accumulent de multiples délétions.[64,270,271] De plus, les travaux du groupe de Chen ont montré que l'absence de mitofusine 1 et 2 dans le muscle squelettique, deux protéines cruciales pour la fusion des mitochondries, entrainait une instabilité de l'ADNmt avec accumulation de molécules délétées.[272] Des données *in vitro* ont également permis de montrer que le silencing de *DRP1* et *FIS1* dans une lignée de cybride favorisait l'ADNmt mutant par rapport à l'ADNmt de type sauvage.[273] Chez la levure, la mitophagie a été montrée comme essentielle pour réduire la proportion de molécules d'ADNmt mutées[274], et le traitement à la rapamycine, une molécule inhibitrice de la voie de signalisation mTOR et capable de stimuler la mitophagie, entraine la sélection de molécules d'ADNmt sauvage au détriment des molécules mutées dans un modèle de cybride.[275]

1.10.4. Modulation génétique de la dynamique mitochondriale

Afin d'induire un défaut de fission ou de fusion chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}, ces dernières ont été croisées avec des souris présentant une haplo-insuffisance en protéines DRP1 ou OPA1, des acteurs majeurs de ces deux processus.

Les souris *Opa1*^{delTTAG} ont été développées par Emanuelle Sarzi et Guy Lenaers.[276] Ce modèle de souris est particulièrement intéressant puisque les mutations d'*OPA1* sont souvent associées à des pathologies mitochondriales impliquant une instabilité de l'ADNmt.[82] Elles présentent la mutation c.2708_2711delTTAG, obtenue en supprimant les 4 pb, TTAG, conservées dans l'exon 27 du gène murin *Opa1*. Cette mutation se retrouve chez 30 % de tous les patients atteints d'AOD.

Opa1^{delTTAG} présente un phénotype poly-dégénératif multi-systémique, avec, entre autres, des signes de défaillance visuelle. De plus, sont constatés des dégénérescences axonales et myéliniques prématurées liées à l'âge, une autophagie / mitophagie accrues, une instabilité du supercomplexe mitochondrial précédant la dégénérescence et la mort cellulaire ainsi que de la COX-déficience dans la rétine et les fibres musculaires de type II.[276]

Les modèles d'haplo-insuffisance de la protéine de fission DRP1, *Drp1*$^{+/-}$, ont été développés pour comprendre sa fonction *in vivo* dans la division des mitochondries et des peroxysomes.[277] Des souris KO bi-alléliques de *Drp1* ont été générées mais elles sont mortes au stade embryonnaire (jour 11). Les CM battaient moins rapidement que ceux des souris WT, suggérant un une implication de la dysfonction cardiaque dans cette mort prématurée des souris *Drp1*$^{-/-}$. Ceci implique l'utilisation de souris hétérozygotes dans notre projet.

1.10.5. Stimulation pharmacologique de la fusion

La molécule choisie pour stimuler la fusion est le « M1 fusion promoter ». Cette molécule a été identité lors d'un screening d'un grand panel de molécules *in vitro*. Le M1 était la molécule la plus efficace, induisant une forte fusion du réseau mitochondrial.[278] Il n'y a que peu de données quant à sa stabilité, et nous avons choisi de l'utiliser en traitement IP journalier, sur une durée maximale de 2 mois, pour en étudier l'impact sur une prise régulière. Une autre alternative aurait été l'implémentation de la molécule dans la nourriture des souris, mais elle ne permet pas de contrôler les doses ingérées. Nous avons choisi de traiter les souris de l'âge de 16 à 18 mois, pour investiguer son éventuel

rôle préventif avant l'installation d'un phénotype d'arythmies ventriculaires (**Figure 45**), ainsi que de 22 à 24 mois pour évaluer son éventuel rôle curatif, une fois les arythmies installées.

En forçant les mitochondries à fusionner, nous espérions induire la complémentation des contenus mitochondriaux pour partager les délétions de l'ADNmt et maintenir un taux acceptable de ces altérations dans les mitochondries.

1.10.6. Stimulation pharmacologique de la mitophagie

Afin de stimuler la mitophagie et avoir un meilleur recyclage des mitochondries, nous avons choisi d'utiliser l'urolithine A. Cette molécule émergeante est découverte par B. Doyle et L. A. Griffiths en 1980 dans l'urine de rats après consommation d'ellagitanins.[279]

Elle peut être synthétisée par le microbiote intestinal à partir d'ellagitanins contenus dans certaines noix ou fruits rouges et surtout dans la peau de grenade, le fruit du grenadier. L'UA stimule à la fois la fission mitochondriale et la mitophagie[280], c'est également un puissant antioxydant et anti-inflammatoire, elle est déjà utilisée en étude clinique[281] et a montré a minima *in vitro* des effets protecteur contre la perte de force musculaire, le diabète, l'obésité, la dégénérescence osseuse, musculaire, cardiaque et cérébrale. Elle augmente également la durée de vie chez *C. Elegans* et la souris, de 19 % chez cette dernière.[282]

D'autre stimulateurs de la mitophagie sont déjà largement utilisés et décrits, notamment la rapamycine, la bafilomycine ou la spermidine, mais aucun n'a les deux avantages de l'UA à savoir un puissant effet pro-mitophagie et l'absence d'effets secondaires notoires.[283]

1.10.7. Analyse des étapes du vieillissement pathologique cardiaque

Dans chaque condition, que ce soit pour voir l'effet de la modulation génomique de l'expression de *Drp1* ou *Opa1* ou l'effet des traitements au M1 ou à l'UA sur le vieillissement cardiaque chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}, les étapes clés d'analyse restent les mêmes. Celles-ci ont été réalisées à 18 mois et à 24 mois, si les effectifs murins le permettaient.

En premier lieu, l'accumulation de délétions dans l'ADNmt a été investiguée de deux manières. Une amplification par qPCR des zones résultantes des 3 délétions les plus courantes chez la souris âgée[81] a été réalisée chez tous les génotypes, ainsi qu'une analyse du panel complet de d'altérations de l'ADNmt par NGS pour voir l'impact de la mutation *Opa1*^{delTTAG}.

En deuxième lieu, le taux de cellules COX^- est analysé par comptage sur cryo-coupe de tissus ayant subi une coloration COX-SDH, mettant en évidence les cellules COX^- en bleu sur fond de cellules saines en brun.[284]

Enfin, l'analyse de la fonction cardiaque a été réalisée par enregistrement des ECG à l'aide de puces de télémétrie chez les souris ayant subi les traitements et les modulations génétiques de *Drp1* et *Opa1*. Malheureusement, à ce jour, l'analyse exhaustive des traces ECG n'est pas encore terminée par nos collaborateurs en Allemagne, et l'impact de nos interventions sur la fonction cardiaque ne peut être que supposé.

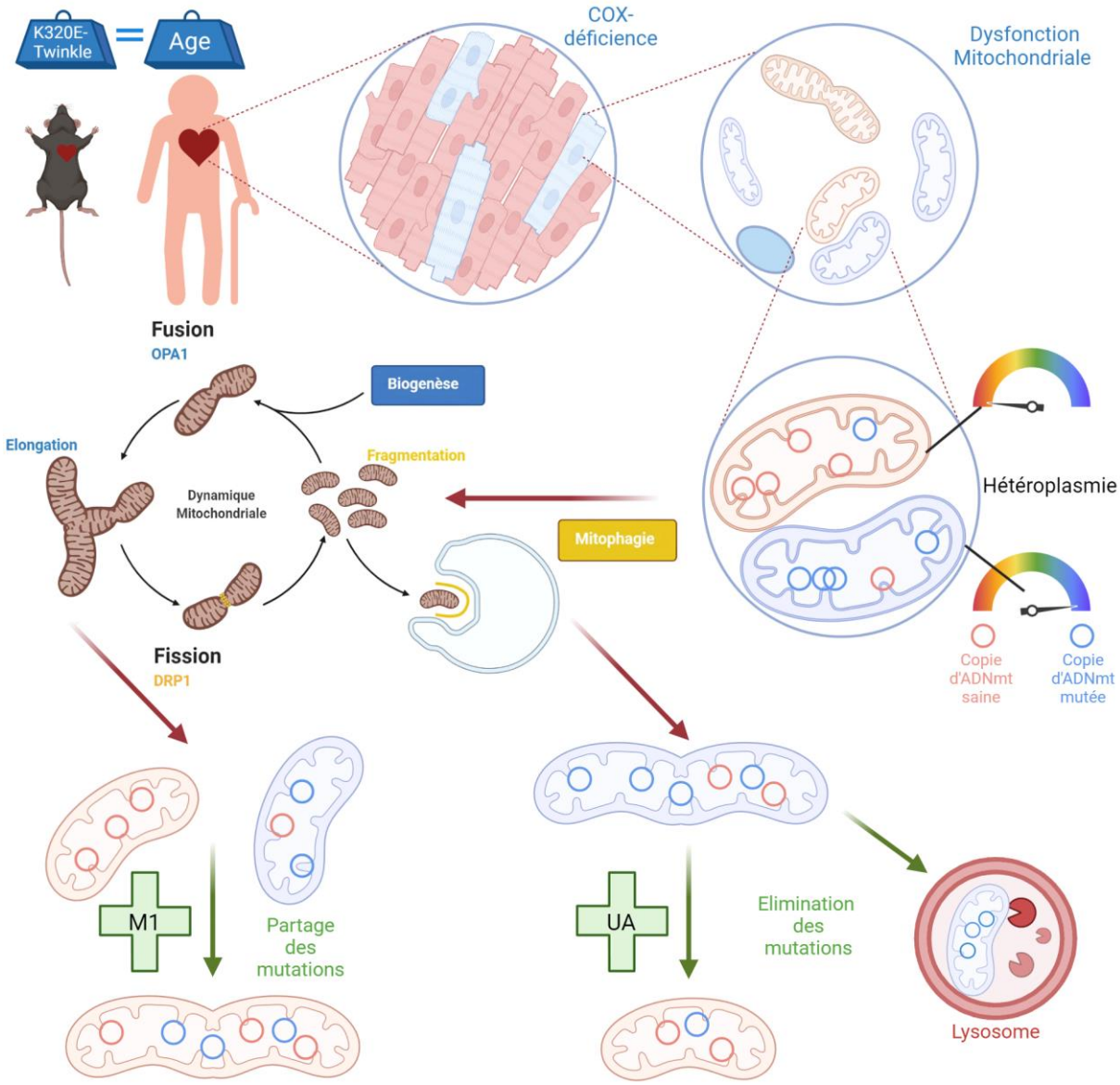


Figure 45 : Schématisation de la réduction de l'hétéroplasmie par le CQ de l'ADNmt

2. Matériel & Méthodes

2.1. Modèles murins

2.1.1. Gestion des animaux

Tous les animaux inclus dans notre projet ont été élevés à l'animalerie présente sur site : le SCAHU (Service Commun d'Animalerie Hospitalo-Universitaire), au sein du bâtiment IRIS2, au niveau du CHU, à Angers. Les animaux ont majoritairement un fond génétique C57BL/6J. Nous avons particulièrement veillé à respecter les directives correspondant au principe des 3 R (réduire, remplacer, raffiner) développé en 1959 par William Russel et Rex Burch.[285] Tous les animaux sont surveillés quotidiennement. La nourriture et la litière sont changées une fois par semaine. Les animaux sont traités au Cothivet® de DirectVet™ à la moindre blessure et une série de points limites a été déterminée en amont du début du projet.

En effet, les animaux sont sacrifiés s'ils présentent : une difficulté à se mouvoir, des plaies vastes ou qui ne se soignent pas, des signes extérieurs de souffrance comme une prostration, un isolement dans la cage ou des mimiques faciales, la présence de tumeurs ou d'autres pathologies liées au vieillissement comme une cataracte sur les deux yeux. De plus, une fois l'âge de 24 mois révolus, les souris sont systématiquement sacrifiées (fin de protocole).

Pour réduire le nombre de souris utilisées, nous avons maximisé le nombre de tissus prélevés sur chacune d'entre elles, la mutation K320E-Twinkle étant exprimée dans le cœur et les muscles squelettiques, nous avons systématiquement prélevé le cœur, le gastrocnémien, le tibialis antérieur, le quadriceps et le soleus.

2.1.2. Souris K320E-Twinkle^{Myo}

Les souris K320E-Twinkle^{Myo} utilisées ont été développées avant le début de mon doctorat.[8] Elles sont issues d'un croisement entre des souris CKM-Cre[286], exprimant une Cre-recombinase sous contrôle du promoteur de la créatine kinase musculaire (CKM) et des souris R26-K320E-Twinkle$^{loxP/+}$, dont le locus *ROSA26* (couramment utilisé en transgenèse murine) porte une construction génétique incluant la séquence codante de *Twnk* présentant la mutation nucléotidique 958 A-->G conduisant au changement de la lysine 320 en glutamate dans la protéine Twinkle, la séquence codante de l'eGFP en aval

d'un site d'entrée de ribosome interne (Internal Ribosome Entry Site, IRES) pour marquage fluorescent des cellules exprimant la mutation de Twinkle et une séquence « STOP » transcriptionnelle WSS (Westphal Stop Sequence) balisée de séquences LoxP. La recombinaison par la Cre-recombinase permet de se débarrasser de la séquence « STOP » et donc d'exprimer fortement, grâce à un promoteur synthétique « CAG », l'hélicase mutée K320E-Twinkle et ce, uniquement dans les tissus CKM-positifs, c'est à dire le cœur et les muscles squelettiques (**Figure 46**).

La spécificité de la Cre-recombinaison dans ce modèle avait été vérifiée par PCR en utilisant l'ADN total extrait des tissus cibles (cœur, muscles) et non-cibles (foie, rein). Les souris de la même portée avec le génotype R26-K320E-Twinkle$^{LoxP/+}$ ont été utilisées comme contrôles.

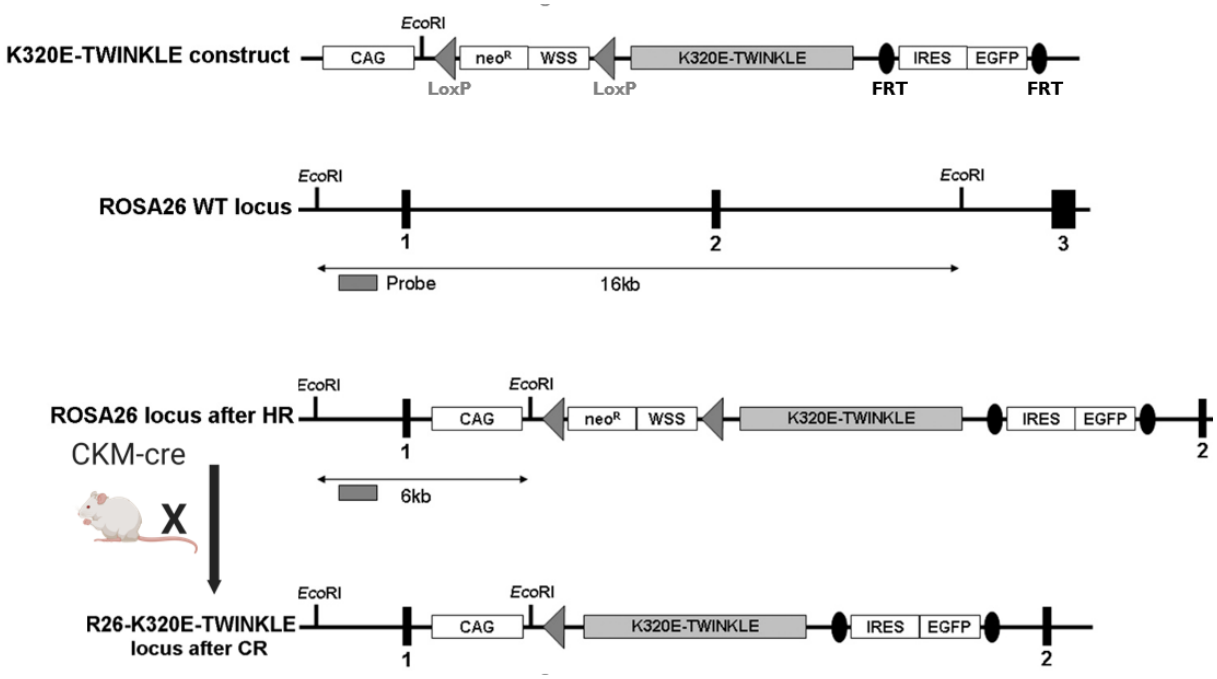


Figure 46 : Stratégie de croisement ayant permis d'obtenir le modèle K320E-Twinkle^{Myo}

Les souris K320E-Twinkle^{Myo} développées à Cologne[8] ont été obtenues après intégration par recombinaison homologue, dans le locus WT *ROSA26*, d'une construction comprenant le promoteur CAG, une cassette contenant un gène de résistance à la néomycine et une séquence WSS STOP. Cette cassette est balisée de séquences LoxP ce qui permet son élimination après action de la Cre-recombinase. La séquence codante de K320E-Twinkle est séparée de celle codant l'eGFP par une séquence IRES. Cette cassette IRES/eGFP est elle-même balisées de séquences FRT, ce qui permet son excision ultérieure par action d'une flippase (FLP), de manière similaire au système Cre/Lox. Adapté de : O. Baris *et al.*, 2015.

2.1.3. *Souris Drp1$^{+/-}$*

La génération de ce modèle KO (Knock-Out) par balisage Cre-Lox et FRT/FRP d'un des allèle de *Drp1* (**Figure 47**) est décrite dans l'article du Dr Junko Wakabayashi.[277] L'invalidation de *Drp1* n'a été faite que sur un seul allèle car le KO total est létal. L'impact de la mutation sur la dynamique mitochondriale a été vérifié en microscopie électronique, plusieurs mitochondries géantes ayant pu être observées sur des coupes de cerveau, au niveau des cellules du réseau de Purkinje.

2.1.4. *Souris Opa1^{delTTAG}*

Les souris *Opa1*^{delTTAG} portent, sur un allèle d'*Opa1*, la mutation récurrente c.2708_2711delTTAG que l'on retrouve chez 30 % des patients présentant une AOD. Elle résulte en une délétion des 58 derniers AA de toutes les isoformes d'OPA1, induisant ainsi une haplo-insuffisance en protéine OPA1 fonctionnelle dans tout l'organisme et par conséquent un déficit en capacité de fusion des mitochondries (**Figure 48**). Etonnamment, les mitochondries chez ce modèle murin étaient moins nombreuses (23 %) et plus grosses dans les fibres musculaires, ce qui pourrait être expliqué par l'observation au microscope électronique de nombreux éléments d'autophagie et de mitophagie, suggérant une élimination accrue des plus petits fragments mitochondriaux.[276]

2.1.5. Croisements K320E-Twinkle^{myo} X *Drp1$^{+/-}$* & K320E-Twinkle^{myo} X *Opa1^{delTTAG}*

Afin d'étudier l'impact de la dynamique mitochondriale sur l'accumulation de délétions de l'ADNmt dans les cardiomyocytes, nous avons utilisé des souris issues de deux croisements. D'une part, le croisement TCD, entre des animaux K320E-Twinkle^{Myo} et *Drp1*$^{+/-}$, pour altérer la fission mitochondriale (*K320E-Twinkle-Cre-Drp1*$^{+/-}$). D'autre part, le croisement TCO, entre des animaux K320E-Twinkle^{myo} et *Opa1*^{delTTAG} pour altérer la fusion mitochondriale (*K320E-Twinkle-Cre-Opa1*^{delTTAG}). Chacune des mutations est mono-allélique et le génotype des animaux est indiqué par l'identifiant du croisement originel (TCD ou TCO) suivi de : C pour Contrôle, D pour *Drp1*$^{+/-}$, O pour *Opa1*^{delTTAG}, T pour K320E-Twinkle^{Myo}, TD pour K320E-Twinkle^{Myo}-*Drp1*$^{+/-}$ et enfin TO pour K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*$^{+/-}$ (**Tableau 5**). Nos résultats montrent une équivalence des animaux

TCD-C avec les TCO-C ainsi que des animaux TCD-T avec les TCO-T, ce qui nous a permis de les réunir respectivement sous les appellations « C » et « T ».

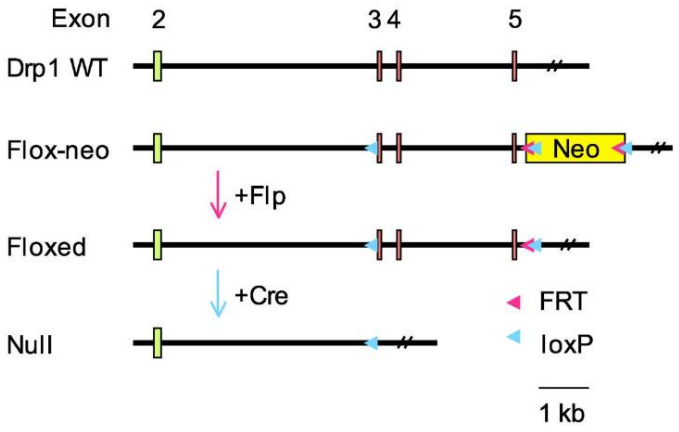


Figure 47 : Stratégie de conception de la lignée de souris *Drp1*$^{+/-}$

De J. Wakabayashi *et al.*, 2009

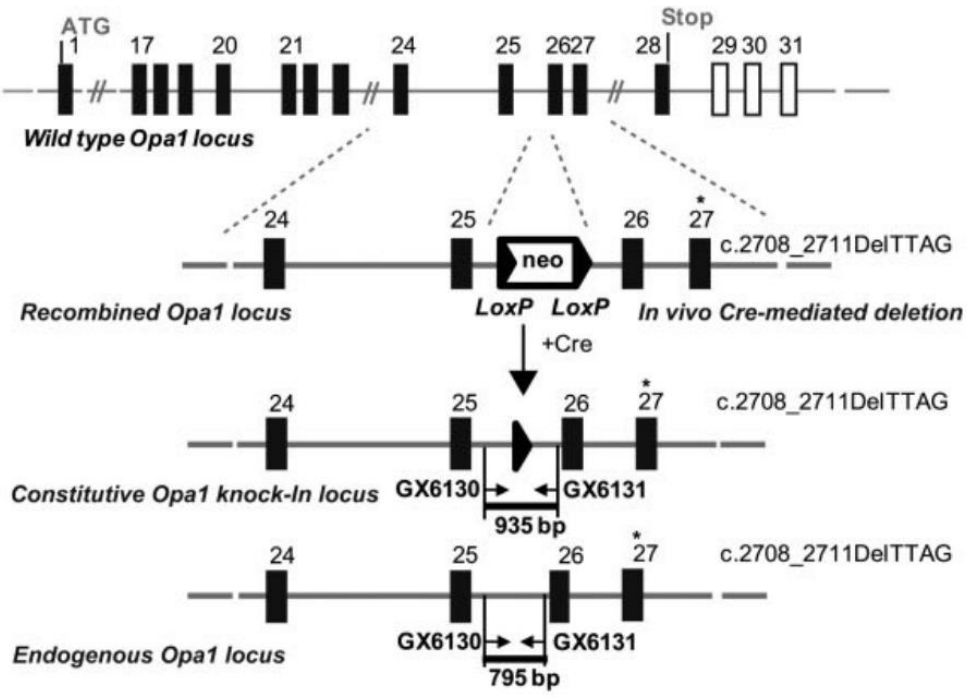


Figure 48 : Stratégie de conception de la lignée de souris *Opa1*^{delTTAG}

DeSarzi *et al.*, 2012

Tableau 5 : Identification génotypique des différentes souris, modèles d'instabilité de l'ADNmt et/ou d'altération de la dynamique mitochondriale

Croisement	Identifiants	Descriptif
Originel R26-K320E-TWINKLE^{loxP} X CKM-Cre	Contrôle **C**	Peut exprimer la Cre-recombinase ou présenter la cassette contenant la séquence codante mutée de *Twinkle* mais qui n'est pas transcrite
	K320E-Twinkle^{Myo} **T**	Exprime la Cre-recombinase et présente la cassette contenant la séquence codante mutée de *Twinkle*, qui est donc transcrite
TCD K320E-Twinkle^{Myo} X *Drp1*$^{+/-}$	Contrôle **C**	Souris issues du croisement entre celles du croisement originel et les modèles *Drp1*$^{+/-}$. Elles peuvent présenter la mutation K320E, le KO hétérozygote de *Drp1*, les deux ou aucun de ces attributs
	Drp1$^{+/-}$ **D**	
	K320E-Twinkle^{Myo} **T**	
	K320E-Twinkle^{Myo}-*Drp1*$^{+/-}$ **TD**	
TCO **K320E-Twinkle^{Myo}** X *Opa1*$^{+/-}$	Contrôle **C**	Souris issues du croisement entre celles du croisement originel et les modèles *Opa1*^{delTTAG}. Elles peuvent présenter la mutation K320E, la mutation hétérozygote delTTAG de *Opa1*, les deux ou aucun de ces attributs
	Opa1^{delTTAG} **O**	
	K320E-Twinkle^{Myo} **T**	
	K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG} **TO**	

2.2. Traitements pharmacologiques des souris

2.2.1. Fusion promoter M1

La molécule M1 ou « fusion promoter M1 » a été identifiée en 2012 par screening comme étant un stimulateur fort de la fusion des mitochondries, permettant leur élongation lorsque les acteurs principaux de la fusion, MFN1/2 et OPA1, sont présents.[278] Le M1 a déjà été utilisé *in vivo* dans plusieurs études chez la souris.[287,288] Nous avons pu, en partant de ces études et en constatant le poids conséquent pris par nos souris lors du vieillissement (elles dépassent souvent les 40 g), adapter la concentration de la solution de M1 à 1,5 $mg.mL^{-1}$ dans un volume de DMSO (diméthylsulfoxide) pour 2 volumes de TWEEN™ 80 en chauffant la solution à 60 °C comme préconisé par MedChemExpress®. Ainsi nous avons pu abaisser le volume de solution finale diluée dans 85 % de PBS (225 $µg.ml^{-1}$) à 200 µL, injectés par voie intrapéritonéale de manière journalière, sur 60 jours. Sont donc administrés 45 $µg.souris.jour^{-1}$, soit un peu plus de 1 $mg.kg.jour^{-1}$ de M1. Le M1 provient de la société BLDpharm®.

2.2.2. Urolithine A

L'urolithine A (UA) est une molécule d'origine naturelle synthétisée par des bactéries intestinales à partir de divers fruits dont ceux du grenadier. Cette molécule polyvalente est surtout connue pour stimuler la mitophagie, c'est une alternative intéressante à la rapamycine ou à d'autres molécules aux nombreux effets secondaires.[283] Utilisée dans de nombreuses études *in vivo* et même précliniques chez l'homme[281], nous avons décidé d'étudier l'effet de l'UA sur l'accumulation accélérée des délétions dans le modèle de souris K320E-$Twinkle^{Myo}$. Une solution mère de 2 $mg.mL^{-1}$ d'UA a été préparée avec un volume d'éthanol pour un volume de DMSO, seul moyen que nous avons trouvé pour diluer la molécule délivrée par BLDPharm® sans trop la chauffer, aucune information n'étant disponible sur sa thermostabilité. Après avoir été diluée dans 95 % de PBS, 200 µL de la solution (20 $µg.souris.jour^{-1}$) sont injectés de manière journalière, soit 2.5 $mg.kg.jour^{-1}$.

2.3.Traitement du tissu cardiaque

Toutes les souris ont été sacrifiées soit par dislocation cervicale, soit par décapitation à la guillotine lorsque le sang devait être récupérer pour d'autres projets. Après sacrifice, les cœurs ont rapidement été prélevés pour être séparés en plusieurs morceaux destinés à différentes manipulations. Les apex ont été récupérés en premier pour être incorporés dans l'OCT puis congelés immédiatement dans de l'isopentane préalablement refroidi avec de l'azote liquide, afin d'éviter des dommages aux tissus lors de la congélation. Les blocs ainsi crées ont ensuite été stockés à -80 °C jusqu'à découpe en sections de 10 µm d'épaisseur au cryostat (Leica® CM3050S), destinées aux colorations chimiques (hématoxyline) ou enzymatiques (COX/SDH).

Le restant du cœur a été séparé en trois tubes Eppendorfs : les oreillettes en vue d'une extraction d'ADN, une moitié du tronçon restant pour les ARNs et la seconde pour les protéines.

Certains cœurs de souris ont été perfusés (perfusion Langendorff) puis étalés en boîte de pétri afin d'isoler les cardiomyocytes pour les fixer pendant 1 h dans une solution tampon (0.1 M phosphate, pH 7.4) contenant 4 % de PFA (paraformaldéhyde).

Les cardiomyocytes ont ensuite subi les manipulations suivantes : centrifugation 5 min à 500 rpm, rinçage à la solution tampon, 5 min à 500 rpm, 3 remplacements de la solution tampon avec implémentation de 0.2 % de glycine durant 10' puis 5' à 500 rpm, rinçage, incorporation de solution à 10 % de gélatine de porc tiède, 2' à 3500 rpm, 30' à 4 °C, découpe de la gélatine en solution tampon à 2.3 M de sucrose, 2 h à 4 °C puis congélation à -80 °C après dépôt dans une goutte de sucrose sur un clou à congélation.

Ultérieurement le cube a été découpé à l'ultracryomicrotome en sections de 300 nm d'épaisseur à 120 °C pour une vitesse de section de 0.4 $mm.s^{-1}$.

Les coupes ont ensuite été prélevées dans une goutte de solution de sucrose puis déposées sur lamelles de verres destinées à des immunofixations observables au microscope confocal à épifluorescence.

Lors du sacrifice, les muscles Quadriceps, Gastrocnémien, Tibialis Antérieur et Soléaire (Q, G, TA et S) ont été aussi prélevé et traités de la même façon afin de pouvoir reproduire les analyses histologiques réalisées dans le cœur.

2.4.ADN

2.4.1. Extraction

Afin de faciliter la digestion des échantillons de cœurs de souris par activité de la protéinase K, ils ont été dilacérés en fins fragments à l'aide de ciseaux chirurgicaux, directement dans du tampon de lyse, en tubes Eppendorf. L'ADN total a ensuite été extrait à l'aide d'un kit à colonnes « DNeasy® Blood & Tissue» de Qiagen™ en suivant le protocole fourni. L'ADN issu de l'extraction a été dosé au spectrophotomètre Nanodrop™ (Thermo Scientific) puis dilué à 5 $ng.\mu L^{-1}$ pour utilisation ultérieure dans nos différents protocoles de PCR. Pour les cellules transfectées ou les fibroblastes, des culots secs de 80.000 cellules minimum ont été congelées à 80 °C et lors de l'extraction, 200 µL de PBS ont été ajoutés avant l'utilisation du kit précédemment cité.

2.4.2. PCR

2.4.2.1. Amorces

Toutes les amorces nucléotidiques utilisées chez la souris sont présentées dans le (

Tableau 6).

2.4.2.2. PCR simple & migration sur gel

Afin de génotyper nos échantillons murins, nous avons amplifié les séquences WT (Wild-Type) et mutantes avec un même couple d'amorces (

Tableau 6) de : *Twnk*, *Drp1* et *Opa1* par PCR. Après migration dans un gel d'agarose 2 %, puis traitement avec un agent intercalant (GelRed®, Biotium™), les signaux ont été

observés sur un imageur Odyssey® (Li-COR®). Les échantillons ont été préparés et amplifiés comme indiqué dans les tableaux ci-dessous (**Tableau 7** et **Tableau 8** respectivement).

Tableau 6 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour initier les PCR

Espèce	Manipulation	Amplicon	Amorces en 5'→3'	Référence
Souris	Génotypage	MCK-cre	GTTCTTAAGTCTGAACCCGG ATGTTTAGCTGGCCCAAATGT GTCTGGATGACATCGTCCAG	Baris *et al.*, 2015
		Twnk	AAAGTCGCTCTGAGTTGTTATC GATATGAAGTACTGGGCTCTT TGTCGCAAATTAACTGTGAATC	Baris *et al.*, 2015
		Drp1$^{+/-}$	CACTGAGAGCTCTATATGTAGGC ACCAAAGTAAGGAATAGCTGTTG GAGTACCTAAAGTGGACAAGAGGTCC	Wakabayashi *et al.*, 2009
		Opa1^{delTTAG}	GGAGGATGTGTGTATAGCATAGCCATTGG CAAAACCACCAAGTAGTGCTCAGGACG	Sarzi *et al.*, 2012
	Quantification des délétions	Délétion A	GGAATTTCACCACTTAACCCT TAGCTGTTATAGAAGTGGCGA	Neuhaus *et al.*, 2014
		Délétion B	AGATGAATCAACCTGTACACTG ATGCGGTGAATAATAGATGGG	
		Délétion C	TCGTAACAAGGTAAGCATACTG CTCGCGGACTAGTATATCCT	
		D-loop	CATAAACACAAAGGTTTGGTCC CTAGGCAAGGTGTCTTAAGC	
	Nombre de copies d'ADNmt	*Nd1*	CTAGAAACCCCGAAACCAAA CCAGCTATCACCAAGCTCGT	Malik *et al.*, 2016
		B2m	ATGGGAAGCCGAACATACTG CAGTCTCAGTGGGGGTGAAT	
	PCR Demi-longues pour NGS	DL1	GCCTGACCCATAGCCATAATA CCTGTTGTCAGATTCACAGTCTA	
		DL2	CTACCCCCTTCAATCAATCT	

			CCGGTTTGTTTCTGCTAGGG	

Tableau 7 : Préparation pour PCR classique

Volume (µL)	Réactif
10	DreamTaq Green PCR Master Mix
5	H_2O
3	ADN (15 ng)
2	Mix amorces (10 µM)

Tableau 8 : Programme de PCR classique

Cycles	Température (°C)	Temps
1	95	3′
39	95	20″
	59	30″
	72	50″
1	72	3′

2.4.2.3. qPCR

Nous avons utilisé une approche par qPCR (PCR quantitative) avec le SYBR Select Master Mix (Thermo Fisher Scientific) pour quantifier le nombre de copies d'ADNmt et 3 de ses délétions typiquement retrouvées au cours du vieillissement[81] nommées ici A, B et C (**Figure 49**) grâce à des amorces spécifiques (

Tableau 6).

Les amorces ont été utilisées à une concentration de 10 µM. Le programme utilisé était le même pour tous les couples d'amorces : 3 min à 95 °C puis 40 fois : 10 s à 95 °C, 30 s à 58 °C. Ensuite une courbe de fusion a été obtenue en augmentant progressivement la

température de 50 à 95 °C, ce qui nous a permis par la suite de vérifier la spécificité des amplifications. Pour chaque échantillon et chaque couple d'amorces, les PCR ont été réalisées en triplicats sur plaque 96 puits. Les quantifications relatives ont été déterminées à l'aide des valeurs Ct (Cycle treshold) moyennes des triplicats, en utilisant la formule de normalisation $2^{-(Ct_amplicon\ d'intérêt\ -\ Ct_amplicon\ de\ référence)}$.[277] Les échantillons ont été préparés et amplifiés comme indiqué dans les tableaux ci-dessous (**Tableau 9**, **Tableau 10**). Pour le nombre de copies d'ADNmt, la même formule a été utilisée pour normaliser le signal de la séquence mitochondriale amplifiée sur celui de la séquence de *B2M*, un gène nucléaire.

Tableau 9 : Préparation pour qPCR

Volume (µL)	Réactif
5	2X SYBR® Green Master Mix
2	H2O
2	ADN (15 ng)
1	Mix amorces (10 µM)

Tableau 10 : Programme de qPCR

Cycles	Température (°C)	Temps
1	95	3′
30	95	10″
	58	30″
1	50	1″
45	+1	1″

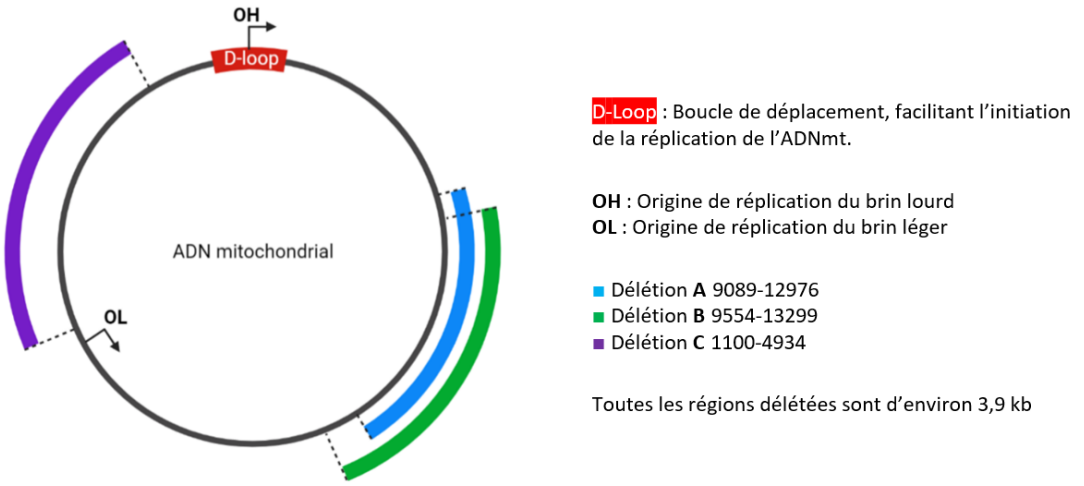


Figure 49 : Positionnement des délétions les plus communes de l'ADNmt chez la souris

Selon Tanhauser & Laipis (1995)

2.4.2.4. Séquençage de l'ADNmt (NGS)

Objectif

Afin de déterminer de manière exhaustive le panel de délétions dans l'ADNmt extrait des cœurs des différents modèles de souris, un séquençage de nouvelle génération (NGS) a été réalisé. Il a d'abord été nécessaire d'amplifier l'ADNmt entier puis de le fragmenter pour réaliser une librairie de fragments sur lesquels sont liés des adaptateurs. Cette librairie est tamisée sur E-gel™ selon une taille de fragments flanqués d'adaptateurs attendue de 250 pb avant d'être séquencée. Les données ainsi obtenues pour chaque fragment sont compilées informatiquement pour reconstituer des copies virtuelles d'ADNmt avec une représentation de toutes les délétions présentes.

Amplification de l'ADNmt

L'ADNmt a été amplifié en 2 fragments chevauchants d'environ 8500 pb couvrant son entièreté, par deux PCR dites demi-longues à l'aide de deux couples d'amorces (DL1 et DL2) et le mélange réactionnel indiqué dans le (**Tableau 11**). Le programme du thermocycleur, légèrement adapté, est indiqué ci-dessous (**Tableau 12**).

Tableau 11 : Préparation pour PCR demi-longue

Volume (µL)	Réactif
31.5	H2O
5	10X LA PCR Buffer II
5	25 mM MgCl2

8	Mix dNTP (2.5 mM de chaque)
4	ADN (20 ng)
1	Mix amorces (10 µM)
0.5	TaKaRa LA Taq Polymérase

Tableau 12 : Programme de PCR demi-longue pour NGS

Cycles	Température (°C)	Temps
1	94	5′
40	94	30″
	62	20″
	68	5′
1	68	3′

Purification

Afin de purifier l'ADN, nous avons utilisé un système à billes magnétiques Agencourt AMPure XP (Beckman Coulter™) Après homogénéisation, 60 µL de billes ont été utilisés pour reprendre chaque produit d'amplification précédemment obtenu, dans une nouvelle plaque 96 puits. Après 5′ de fixation de l'ADN aux billes, la plaque a été posée sur un portoir magnétique jusqu'à ce que les billes forment un culot. Après élimination du surnageant, l'ADN a été précipité avec 150 µl d'éthanol à 70 % en tournant la plaque pour que les billes parcourent deux fois la paroi du puit. Cette étape est répétée après avoir changé l'éthanol, puis la plaque est centrifugée et laissée à sécher pendant 4′ 30″. L'ADN dans chaque puits est resuspendu dans 50 µl d'eau stérile durant 2′ afin de pouvoir le décrocher des billes. Le portoir magnétique est utilisé à nouveau afin de culotter les billes magnétiques, ce qui permet de récupérer l'ADN purifié pour le doser au Qubit2™ de chez Invitrogen™.

Création de la librairie de séquences

L'ADN ainsi purifié est d'abord fragmenté en une « librairie » de petites séquences en utilisant le kit « Ion Xpress™ Plus Fragment Library Kit » de Ion Torrent™ (4471269), grâce au mix réactionnel présenté ci-dessous (**Tableau 13**). Ensuite la réaction est stoppée comme décrit dans le manuel du fournisseur et l'ADN est de nouveau purifié, mais cette fois avec 99µL de billes magnétiques.

Tableau 13 : Préparation des fragments d'ADNmt pour séquençage NGS

Réactif	Volume (µL)
Produit de PCR (100 ng)	X

H_2O pure	35 – X
Ion Shear Plus 10X Reaction Buffer	5

Ligation des adaptateurs

Ensuite l'ADN est soumis à une ligation avec des adaptateurs via la préparation décrite ci-dessous (**Tableau 14**) en restant incubé à 25 °C pendant 15' et à 72 °C pendant 5'. Les produits de PCR sont ensuite conservés à 4 °C avant d'être de nouveau purifiés, cette fois dans 140 µL de billes magnétiques.

Tableau 14 : Préparation pour ligation des adaptateurs de séquençage NGS

Réactif	Volume (µL)
ADN fragmenté et purifié	25
10X Ligase Buffer	10
Ion P1 Adaptor	2
Ion Xpress Barcode	2
dNTP Mix	2
H_2O pure	49
ADN Ligase	2
Nick Repair Polymerase	8

Sélection des fragments flanqués d'adaptateurs par la taille moléculaire

Afin de purifier les fragments de la librairie correspondants à la taille attendue lorsqu'ils sont flanqués d'adaptateurs nécessaires à la réaction de séquençage ultérieure, un E-gel™ est inséré dans la base du E-gel safe Imager™ de chez Invitrogen™. Après électrophorèse de 20 µL de librairie (puits de dépôt), les fragments à la taille attendue de 250 pb sont récupérés dans 20 µl d'eau pure au niveau des puits de recueil (**Figure 50**). Les puits de recueil sont ensuite rincés avec 10 autres µL d'eau et le tout est réuni (30µl au total).

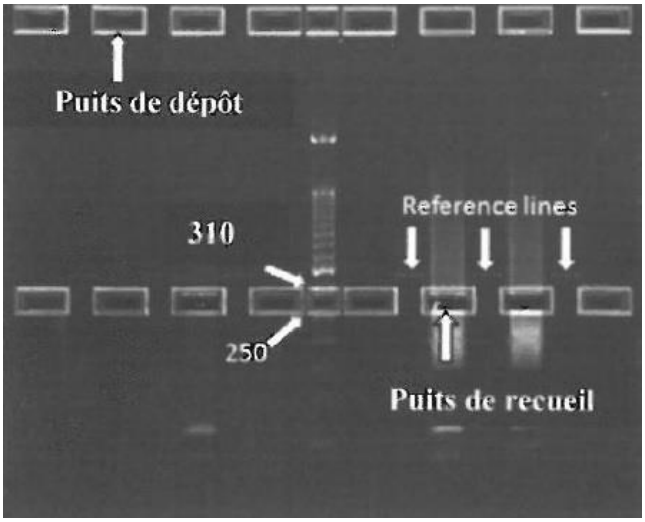


Figure 50 : Image de la construction de l'E-Gel™

Amplification de la librairie

La librairie maintenant acquise, il reste à effectuer une dernière amplification haute-fidélité avec la préparation et le programme ci-dessous (**Tableau 15,**

Tableau 16), afin d'avoir assez de matériel pour le séquençage. Cette étape est une fois de plus suivie d'une purification, cette fois avec 195 µL de billes magnétiques. La librairie est alors dosée au Qubit™.

Tableau 15 : Préparation pour PCR d'amplification de la librairie (NGS)

Réactif	Volume
Platinum PCR SuperMix High Fidelity	100
Library Amplificaiton Primer Mix	5
Librairie (250 pb)	25

Tableau 16 : Programme de la PCR d'amplification de la librairie (NGS)

Cycles	Température (°C)	Temps
1	95	5′
8	95	15″
	58	15″
	70	1′
1	4	---

Séquençage NGS avec le séquenceur Ion Torrent™ S5 XL

La librairie est soumise à une PCR émulsion puis est chargée sur une puce semi-conductrice Ion Chip 540™ grâce à l'appareil Ion Chef™ et au kit Ion 540™ Kit-Chef. La puce ainsi chargée est introduite dans le séquenceur Ion S5™ XL System qui est l'appareil réalisant le séquençage. La puce est soumise aux différents nucléotides chargés au préalable dans le séquenceur, les uns après les autres. Lorsqu'un nucléotide est incorporé, un ion H^+ est libéré ce qui provoque une variation du pH du milieu, détectée par la puce semi-conductrice sous forme de différence de potentiel proportionnelle aux nombres de nucléotides incorporés. À la suite du séquençage, l'ionogramme (fichier FASTQ) obtenu est démultiplexé, c'est à dire que les séquences sont triées selon leurs codes-barres. Puis, les séquences sont alignées sur le génome mitochondrial de Mus *musculus* (Mapping), avec un fichier .bam visualisé sur le logiciel eKLIPse (Goudenège et al 2019)[289] afin de détecter les délétions de l'ADNmt et de les quantifier de manière sensible et spécifique.

2.5. Protéines

2.5.1. Anticorps

La cible, la référence, le fournisseur, l'animal hôte, la dilution et, pour le Simple Western®, la concentration protéique, sont présentés dans le tableau ci-dessous (**Tableau 17**). LC3B et p62 ont été révélés sur membrane de PVDF avec un anticorps secondaire couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase), et toutes les autres protéines sur membrane de nitrocellulose en utilisant des anticorps secondaires couplés à un fluorophore ou via Simple Western®.

Tableau 17 : Liste des anticorps utilisés

Simple Western®					
Primaires					
Cible	**Référence**	**Fournisseur**	**Hôte**	**Dilution**	**[Prots.]**
DRP1	8570	Cell Signaling	Lapin	1/50	0,5mg/ml
OPA1	MAB9506	R&D Systems	Lapin	1/250	0,5mg/ml
PINK1	NBP1-49678	BioTechne	Lapin	1/50	0,5mg/ml
BNIP3	3769S	Cell Signaling	Lapin	1/25	1mg/ml
Secondaires					
Cible	**Référence**	**Fournisseur**	**Émission (nm)**	**Dilution**	
Lapin	042-206	Biotechne	600 (chimi)	/	

Souris	042-205	Biotechne	600 (chimi)	/	
Western Blot					
Primaires					
Parkin	4211	Cell Signaling	Souris	1/1000	
LC3B	2775	Cell Signaling	Lapin	1/2000	
p62	ab109012	Abcam	Lapin	1/1000	
GAPDH	ab9484	Abcam	Souris	1/5000	
β-actine	ab179467	Abcam	Lapin	1/5000	
β3-tubuline	Ab7291	Abcam	Souris	1/5000	
Secondaires					
Cible	**Référence**	**Fournisseur**	**Émission (nm)**	**Dilution**	
Lapin	TNB72-8073	Ozyme	600 (chimi)	1/10.000	
Souris	TNB72-8062	Ozyme	600 (chimi)	1/10.000	
Lapin	ab186696	Abcam	680	1/10.000	
Souris	ab186695	Abcam	790	1/10.000	
Immunofluorescence					
Primaires					
Cible	**Référence**	**Fournisseur**	**Hôte**	**Dilution**	
LC3B	ab48394	Abcam	Lapin	1/200	
LAMP2	ab13524	Abcam	Rat	1/800	
VDAC1	ab14734	Abcam	Souris	1/200	
Secondaires					
Cible	**Référence**	**Fournisseur**	**Émission (nm)**	**Dilution**	
Lapin	A11008	Invitrogen	488	1/10.000	
Lapin	A21245	Invitrogen	647	1/10.000	
Souris	A11001	Invitrogen	488	1/10.000	
Souris	A21235	Invitrogen	647	1/10.000	
Rat	ab150150	Abcam	555	1/10.000	

2.5.2. Extraction et purification des protéines

Tous les tissus de souris ont subi un protocole d'extraction comprenant une réduction en poudre en mortier-pilon refroidi à l'azote puis une homogénéisation au Polytron (PT2100, Kinematica®) dans 300 µL du tampon d'extraction (**Tableau 18**) contenant 1 % de cocktail d'inhibiteurs de protéases et phosphatases ainsi que 1 % d'EDTA (inhibitor cocktail 100X Halt™, ThermoFisher®). Après centrifugation à 13.000 g pendant 1 h, le surnageant, contenant les protéines extraites, est récupéré.

Tableau 18 : Composition du tampon d'extraction de protéines

Composé	Concentration
Chlorure de potassium	20 mM
EDTA	2.5 mM
EGTA	2.5 mM
Fluorure de sodium	40 mM
Glycerol	10 %
Hepes	30 mM
Nodidet p40	0.1 %
Orthovanadate de sodium	1 mM
Pyrophosphate de sodium	4 mM

2.5.3. Analyses protéiques semi-quantitatives

2.5.3.1. Dosage

Les protéines ont été dosées selon les instructions du kit « PIERCE® BCA Protein Assay », via l'équation de la droite de régression des valeurs d'absorbance d'une gamme étalon de 0 à 1 $mg.mL^{-1}$ sur plaque 96 puits. Les absorbances des échantillons et leur conversion en concentration protéique à l'aide de la gamme ont été obtenues grâce au lecteur de plaque CLARIOstar® (BMG LABtech®).

2.5.3.2. Simple Western®

Afin d'évaluer l'expression protéique de différents acteurs de la dynamique mitochondriale ou la mitophagie dans les cœurs de souris, nous avons utilisé le système « Jess™ » de Simple Western® (Biotechne™), une technique similaire au Western Blotting mais dont la matrice de séparation diffère dans sa composition. Les protéines ont été séparées selon leur taille moléculaire (kDa) grâce à des capillaires adaptés pour la fluorescence et la chimiluminescence (SM-FL004), conformément au protocole du fournisseur. La quantification résulte de la normalisation du signal obtenu pour chaque protéine d'intérêt par chimiluminescence sur le signal des protéines totales, grâce au kit du fournisseur prévu à cet effet (DM-PN02). Les anticorps primaires ne figurant pas sur la base de données du fournisseur ont été validés selon les instructions fournies par Biotechne™. Cela nous a permis de définir les dilutions optimales des anticorps et des protéines à utiliser, qui sont indiquées dans le (**Tableau 17**).

2.5.3.3. Western Blotting

D'autres évaluations ont été réalisées par Western Blotting classique, faute d'anticorps validés sur la base de données de Biotechne™, notamment LC3B, incompatible avec le Simple Western®.

Pour chaque protéine d'intérêt, 48 µg de protéines ont été dénaturés 5' à 95 °C dans du tampon Laemmli complété avec 0.5 M de DTT avant que 40 µg soient déposés sur des gels pré-coulés de polyacrylamide en gradient de 4 à 20 % dans des cuves pour électrophorèse. Les protéines ont ensuite été transférées (transfert semi-liquide) sur membranes de PVDF ou de nitrocellulose. Tous les éléments précédemment cités ont été fournis par Biorad™. Après saturation dans du TBST (Tris-Buffered Saline, Tween® 20) implémenté de lait lyophilisé (5 %), une incubation sur la nuit à 4 °C avec les anticorps primaires, 3 rinçages de 5' au TBST, une incubation 2 h à température ambiante avec les anticorps secondaires, la membrane est rincée 3 fois 5' au TBS. Les membranes sont ensuite révélées à l'imageur Odyssey® 2800 de LICORbio™, à 680 ou 790 nm selon l'anticorps secondaire fluorescent utilisé ou à 600nm après incubation de la membrane avec 1 mL du mix de substrat pour anticorps couplés à l'HRP (Horse Radish Peroxidase) du kit West Femto Supersignal™ de Thermo Scientific™. Pour le détail des anticorps utilisés, voir (**Tableau 17**).

2.5.4. Immunomarquages

Après obtention des cardiomyocytes par perfusion Langendorff de collagénases, fixation au PFA et inclusion en cube de gélatine de porc, des cryo-coupes ont été effectuées pour analyser la colocalisation des protéines de la membrane des mitochondries (VDAC-1), des lysosomes (LAMP2) et l'adaptateur de l'autophagie LC3B afin de pouvoir visualiser et quantifier les évènements de mitophagie dans le cœur de souris WT et K320E-Twinkle^{Myo}.

Dans cette optique les coupes ont été rincées au PBS, incubées dans le PFA (4 %) 20' à 4 °C. Elles ont ensuite été rincées 3 fois 5' sous agitation pour être perméabilisées grâce à une solution de PBS à 0.2 % de TritonX-100 (Sigma™ T8787). La coupe est de nouveau rincée 3 fois avant d'être saturée 30' sous agitation dans une solution de 1 % de BSA (ACROS ORGANICS™, 268131000). La coupe est ensuite incubée avec les anticorps primaires sur la nuit à 4 °C, puis 1 h à température ambiante pour les secondaires, toujours sous agitation, mais dans le noir cette fois-ci, pour protéger les fluorophores.

Les coupes ont été rincées 3 fois au PBS puis conservées dans une goutte d'une solution de sucrose à 2,3 M (Sigma-Aldrich, S9378) avant d'être observée au microscope confocal à épifluorescence.

2.6. Histochimie

2.6.1. Coloration à l'hématoxyline

L'hématoxyline, oxydée en hématéine, marque les noyaux des cellules en indigo grâce au pH des acides nucléiques. Cette coloration s'accompagne traditionnellement d'une coloration des substances basiques du cytoplasme à l'éosine leur donnant une couleur rosée. Souhaitant marquer uniquement les noyaux pour compter les cellules, la coloration à l'éosine n'était pas nécessaire dans notre cas. Les lamelles ont été incubées 5 min dans un bain d'hématoxyline, puis déshydratées et fixées progressivement grâce à une série de bains de 2 min dans des solutions à 75 %, 95 % puis 100 % d'éthanol et enfin deux bains de 5 min dans du xylène.

2.6.2. Double coloration enzymatique COX/SDH

Le cytochrome-c, substrat de la cytochrome-c-oxydase (COX), purifié à partir de cœur de cheval, est dilué à 1 $mg.mL^{-1}$ dans un tampon de dihydrogénophosphate de sodium (NaH_2PO_4) à 0.1 M ajusté à pH 7. Le diaminobenzidine (DAB) ajouté à cette solution va permettre d'évaluer l'activité de la COX. En effet, le DAB est un donneur d'électrons pour la CR, et il devient marron lorsqu'il est oxydé. La coloration des lamelles est réalisée en cuve à 37 °C pendant 15 min. Les lamelles sont ensuite rincées à l'eau distillées avant la seconde coloration (SDH). Le succinate de sodium, substrat de la succinate déshydrogénase (SDH), est dilué à 54 $mg.mL^{-1}$ dans du tampon NaH_2PO_4 à 0,2 M. L'ajout de chloride de tetrazolium nitroblue va permettre d'évaluer l'activité de la SDH, car c'est un accepteur artificiel d'électron qui passe d'une couleur jaune lorsqu'il est oxydé à une couleur bleue lorsqu'il est réduit. La coloration des coupes est réalisée en cuve à 37 °C pendant 10 min. Avant d'être observées, les lamelles sont rincées à l'eau distillée puis déposées sur lame dans une goutte d'Aquatex® afin de préserver le milieu aqueux des cellules nécessaire au maintien de la coloration enzymatique.

2.7.Imagerie

2.7.1. Acquisitions

2.7.1.1. Leica Slide Scanner

Afin de visualiser avec précision (40 X) les coupes d'apex de cœur après marquage ou coloration, nous avons acquis les images via le système Aperio Scanscop® CS2 de Leica Biosystems™, et utilisé le logiciel associé Aperio ImageScope® de Leica Biosystems™ pour réaliser les comptages de cellules COX^-.

2.7.1.2. Microscopie électronique à transmission

Les tissus de souris sont dans un 1er temps fixés avec une solution de glutaraldéhyde 2,5 % et paraformaldéhyde 2,5 % dans du tampon phosphate 0,1 M à pH 7,4 sur la nuit (fixation des protéines). Dans un second temps elles sont rincées au PBS puis baignées dans une solution de tétroxyde d'osmium 1 % pendant 1 h, puis rincées (fixation des lipides, donc des membranes).

Les tissus sont ensuite déshydratés par bains d'éthanol, de 20 min et de concentrations croissantes (50°, 70°, 95°, 100°) puis inclus dans la résine. Cette étape est réalisée en remplaçant l'éthanol par de l'oxyde de propylène, puis avec 1 volume d'oxyde de propylène pour 1 volume de résine Epon, et enfin de résine seule, qui va polymériser à 60°C, chacune de ces étapes durant 20 min.

Les blocs de résine ainsi obtenus sont découpés en sections de 60nm d'épaisseur à l'ultramicrotome, puis déposées sur grilles de cuivre. De l'acétate d'uranyle est utilisé comme agent de contraste puis les coupes sont observées au JEOL™, modèle JEM-1400, utilisé à 120kV.

2.7.1.3. Microscopie Confocale

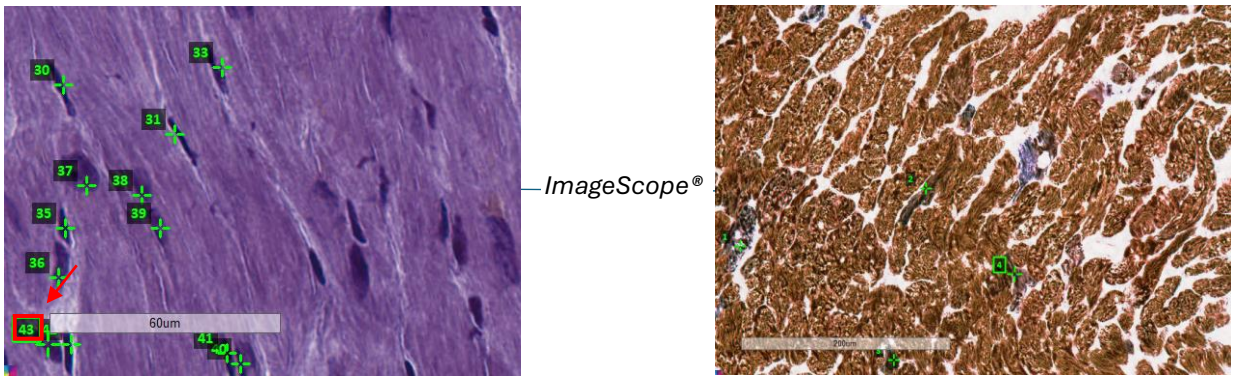
Afin d'observer l'impact de K320E-Twinkle sur la mitophagie chez les modèles murins, nous avons utilisé des plans focaux ou des reconstructions 3D qui résultent de leur assemblage et traitement via le logiciel Imaris (Oxford Instruments) ainsi que le logiciel Hyugens™ (Scientific Volume Imaging), qui a permis leur déconvolution (amélioration de la netteté de l'image). Ces plans ont été obtenus grâce à un microscope confocal à épifluorescence (TCS–SP8, Leica Microsystems). Le marquage des protéines intervenant

dans la mitophagie (LC3B, LAMP2, VDAC1) a été effectué grâce à des anticorps secondaires à fluorescence (**Tableau 17**). Les marquages de l'ADNmt et du réseau mitochondrial ont été réalisés via l'utilisation du Picogreen et du TMRM (ester méthylique de TétraMéthylRhodaMine) respectivement.

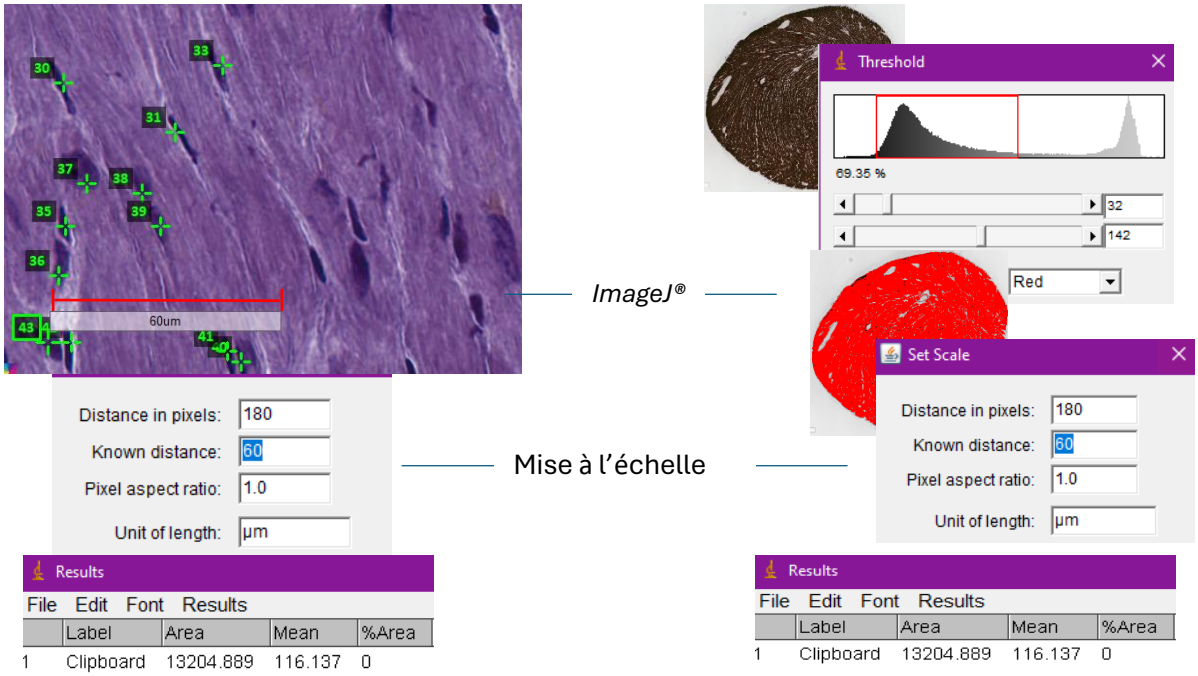
2.7.2. Comptage des cardiomyocytes COX-déficients

Le logiciel ImageJ® nous a permis d'évaluer l'aire tissulaire de chaque section de cœur en µm² en isolant le canal correspondant à la composante rouge de l'image (RGB stacks), puis en ajustant le seuil d'intensité (adjust treshold) afin de sélectionner seulement l'aire de la section occupée par des cellules. Ensuite, une distance en pixel a été associée à la longueur de l'échelle micrométrique présente sur les images extraites du logiciel ImageScope®, permettant au logiciel ImageJ® de calculer l'aire de chaque section en µm². Le nombre de noyaux comptés rapporté sur l'aire de tissu donnant un résultat avec une faible variabilité entre les sections des animaux des 8 génotypes différents, le nombre moyen de cellules par μm^2 dans nos cœurs de souris a été évalué à $2{,}135.10^{-3}$. Enfin, pour chaque section des animaux de la cohorte à analyser, nous avons déterminé le nombre de cellules COX^- par comptage manuel et l'aire en μm^2 des coupes. Cette aire a été multipliée par $2{,}135.10^{-3}$ pour obtenir le nombre approximatif de cellules dans la coupe, puis divisée par 2 pour obtenir le nombre approximatif de cardiomyocytes parmi la variété de types cellulaires présents. Enfin, le ratio du nombre de cellules COX^- sur le nombre de cardiomyocytes par section a été déterminé puis transformé en pourcentage de cardiomyocytes COX^- au sein de la coupe (**Figure 51**).

1) Colorations & Comptages



2) Détermination de l'aire des coupes



3) Quantifications

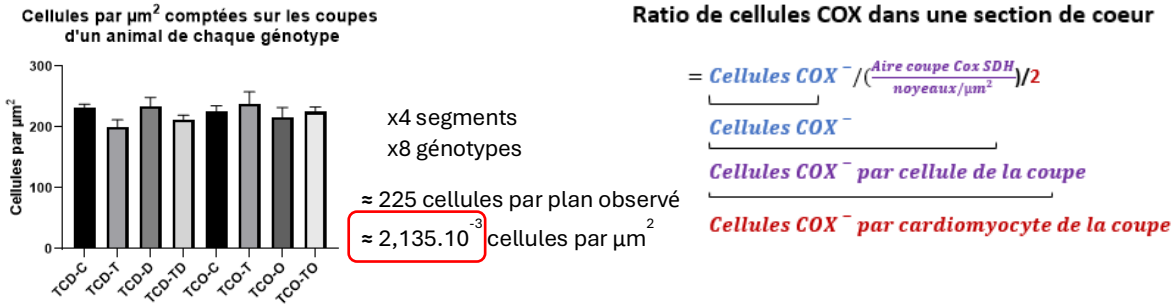


Figure 51 : Méthodologie des comptages effectués sur coupes de cœur de souris

A gauche, l'hématoxyline a permis le comptage des noyaux sur une aire définie sur Image J grâce à l'échelle. A droite, la coloration COX/SDH a permis le comptage des cellules COX^- sur une aire contenant un nombre, maintenant connu, de cellules. Ce nombre est multiplié par deux pour obtenir le nombre de CM COX^- puis transformé en pourcentage.

2.7.3. Traitements des images obtenues au microscope confocal

En premier lieu, le logiciel Huygens™ a permis la séparation des chaines de couleurs des fichiers au format «.lif », obtenus au microscope confocal à épifluorescence, puis une déconvolution en chaîne des images obtenues. Cette procédure a pour objectif d'éliminer un maximum de bruit de fond tout en améliorant le contraste et la netteté en prenant en compte la manière dont la lumière se propage, notamment selon le principe de Huygens qui donne son nom au logiciel, pour obtenir des plans focaux de la meilleure qualité possible.

Dans un second temps, les plans focaux précédemment obtenus ont été convertis en structure 3D via le logiciel Imaris de Oxford Instruments. Ensuite une surface virtuelle a été définie pour les compartiments comme les nucléoïdes ou les mitochondries afin de pouvoir analyser leur volume et leur nombre. Les données ainsi obtenues ont été extraites sur tableur Excel pour pouvoir être moyennées par cellules présentes sur chaque image, pour 10 images par échantillons avec n = 3-6 échantillons.

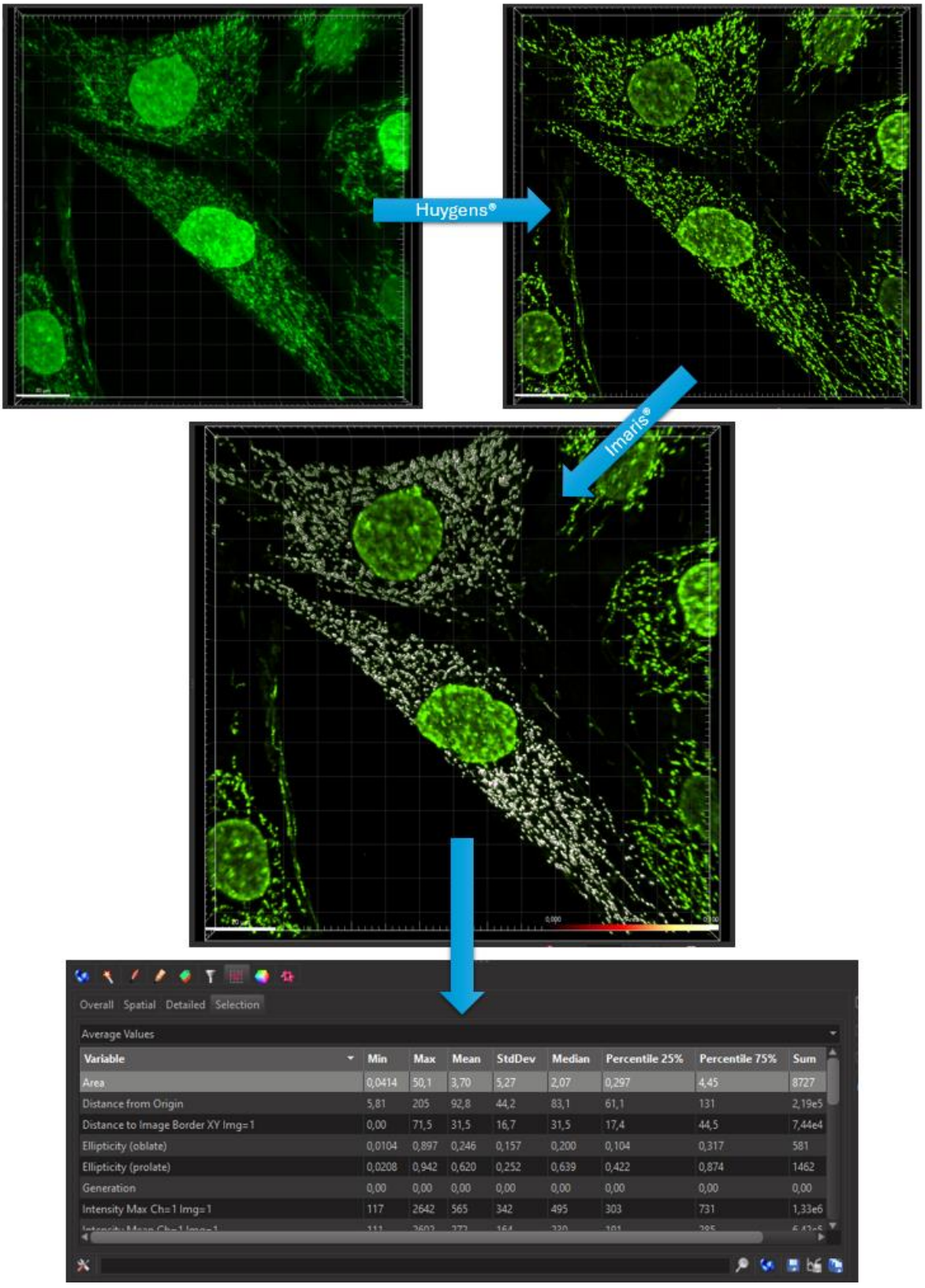


Figure 52 : Exemple d'une image déconvoluée par Huygens® et à laquelle une surface virtuelle a été appliquée sur les nucléoïdes marqués au Picogreen® via Imaris® pour en extraire diverses données

Barre d'échelle : 20 µm

2.8. Télémétrie

2.8.1. Installation des puces de télémétrie

Afin de suivre l'activité cardiaque des souris, des puces PhysioTel® ETA-F10 de chez DSI™ ont été implantées chirurgicalement en position ventrale. Les souris ont été endormies et anesthésiées via injection intrapéritonéale (IP) de pentobarbital puis ont subi une incision de quelque centimètre le long de l'abdomen pour y placer la puce de télémétrie et glisser sous la peau l'anode au niveau de la poitrine et la cathode sous les basses-côtes. Les puces sont connectées à un système informatique pour capter les signaux émis et activée par passage d'un aimant à proximité de celles-ci. Les mesures d'ECG ont été réalisées après 10 jours de récupération post-implantation.

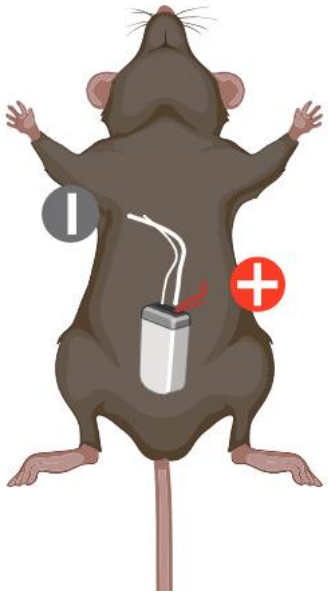


Figure 53 : Positionnement de la puce de télémétrie HD-X10 lors de l'implant chez la souris

Les électrodes sont placées d'un extrême à l'autre de la cage thoracique en sous-épidermique après incision le long de l'abdomen pour placer la puce au niveau du péritoine.

2.8.2. Enregistrement des ECGs

Grâce au logiciel Dataquest ART de chez DSI™, nous avons enregistré les ECGs de n = 3-8 animaux de chaque condition (mutant ou non, ayant subi un traitement

pharmacologique ou avec la solution véhicule), aux âges de 18 et 24 mois. Ces enregistrements ont été effectués sur une période de 24 h de mouvement libre puis 10 ' en situation de stress (nage forcée en cylindre transparent de 15 cm de diamètre). Après ces tests, les animaux ont été sacrifiés pour que leurs tissus cardiaques et musculaires soient récupérés en vue des analyses prévues par la suite, ainsi que les implants de télémétrie, qui sont réutilisables tant que la batterie est chargée.

2.9.Statistiques & réalisations graphiques

Pour chaque ensemble de données, le choix du test statistique dépendait du nombre de jeux de données dont la différence était étudiée ainsi que de la distribution normale ou non des valeurs et la différence d'écart-type entre les ensembles (**Figure 54**). Un test de Shapiro-Wilk a été effectué afin d'établir la normalité des valeurs.

Lorsque la distribution des valeurs ne suivait pas une loi normale, des tests de Mann-Whitney ont été utilisés pour déterminer la significativité des différences observées entre deux valeurs.

Lorsque les valeurs suivent une distribution normale, un test « f » a été effectué afin de savoir si les valeurs avaient une différence significative d'écarts types. Des tests « t » de Student ont été utilisés lorsqu'il n'y avait pas de différence d'écarts-types, une correction de Welch a été appliquée lorsqu'il y'avait une différence d'écart-type

Lorsque plus de 2 ensembles de données ont été comparés, des tests de Kruskal-Wallis avec comparaison multiple ont été utilisés lorsque les valeurs n'étaient pas distribuées selon une loi normale, et des tests ANOVA ou de Brown-Sythe ont été utilisés si, respectivement, le test « f » indiquait des écarts-types égaux ou inégaux.

Tous ces tests ont été réalisés à l'aide du logiciel Graphpad Prism 9, qui a en outre permis de représenter graphiquement l'essentiel des résultats présents dans ce document.

Sur tous les graphiques à colonne, la barre représente l'écart type (SD), et la valeur de la p-value est ainsi représentée : >0.05 : ns (non-significatif), < 0.05 : *, < 0.01 : **, < 0.001 : ***, <0.0001 : ****.

Une grande partie des figures a été réalisée grâce à biorender.com.

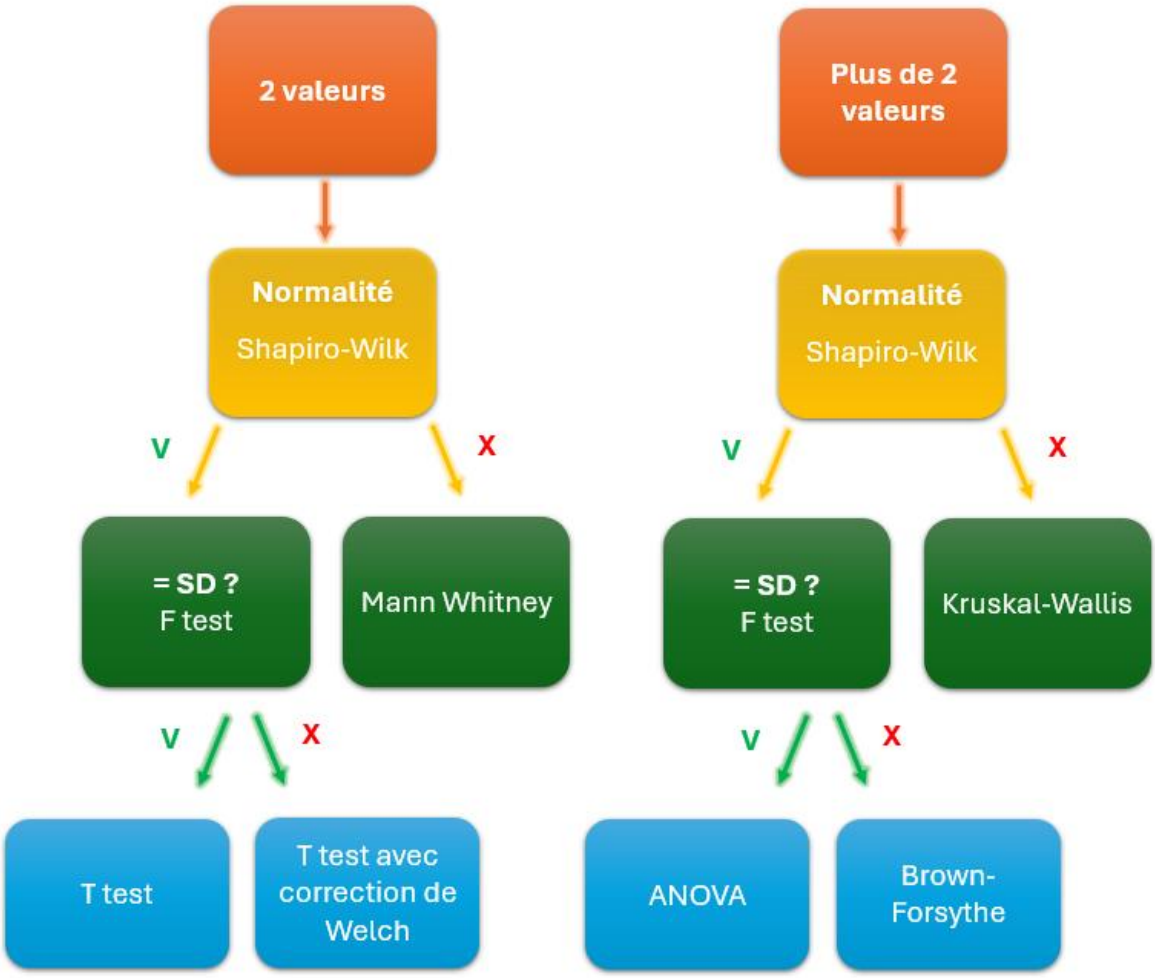


Figure 54 : Schéma logique du choix de test statistique

3. Résultats

3.1. La fusion mitochondriale médiée par OPA1 protège les muscles cardiaque et squelettique de la COX-déficience mais pas de l'accumulation de délétions de l'ADNmt chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}

3.1.1. Validation des modèles

3.1.1.1. Vérification du génotype des animaux inclus dans l'étude

Le génotype des animaux utilisés dans notre étude a été systématiquement revérifié par PCR après sacrifice et prélèvements post-mortem. Notre stratégie pour maximiser le nombre d'animaux d'intérêt obtenus avec un minimum de croisements a été d'utiliser des souris homozygotes pour l'allèle R26-K320E-Twinkle^{fl}, et de les croiser avec des souris positives à la MCK-cre, et soit porteuses d'un allèle *Opa1*^{delTTAG}, soit porteuses d'un allèle *Drp1*$^{-}$. Ainsi, toutes les souris naissaient avec le génotype R26-K320E-Twinkle$^{fl/+}$. Le génotypage final se faisait donc sur les 3 PCR MCK-cre, *Opa1* et *Drp1*, pour lesquelles la présence de deux produits d'amplification de tailles différentes correspondait aux allèles mutés (**Figure 55**).

3.1.1.2. Validation des modèles *Drp1*$^{+/-}$ et *Opa1*^{delTTAG}

Afin de reconfirmer la diminution d'expression des protéines DRP1 et OPA1 chez les modèles développés respectivement par Junko Wakabayashi[277] et Emmanuelle Sarzi[276], nous avons utilisé le système de western-blots automatisé Simple Western™ sur les échantillons des souris précédemment génotypées. Nous retrouvons bien une diminution de l'expression des protéines d'OPA1 (environ 50 % chez les individus *Opa1*^{delTTAG} et double mutants) et DRP1 (environ 25 % chez les individus *Drp1*$^{+/-}$ et 40 % chez les double mutants) (**Figure 56**). De manière intéressante, on observe, chez les animaux porteurs de l'allèle *Drp1*$^{-}$, une légère augmentation significative de l'expression d'OPA1.

Toutefois, l'inverse (augmentation de l'expression de DRP1 en présence de l'allèle *Opa1*^{delTTAG}) ne se vérifie pas.

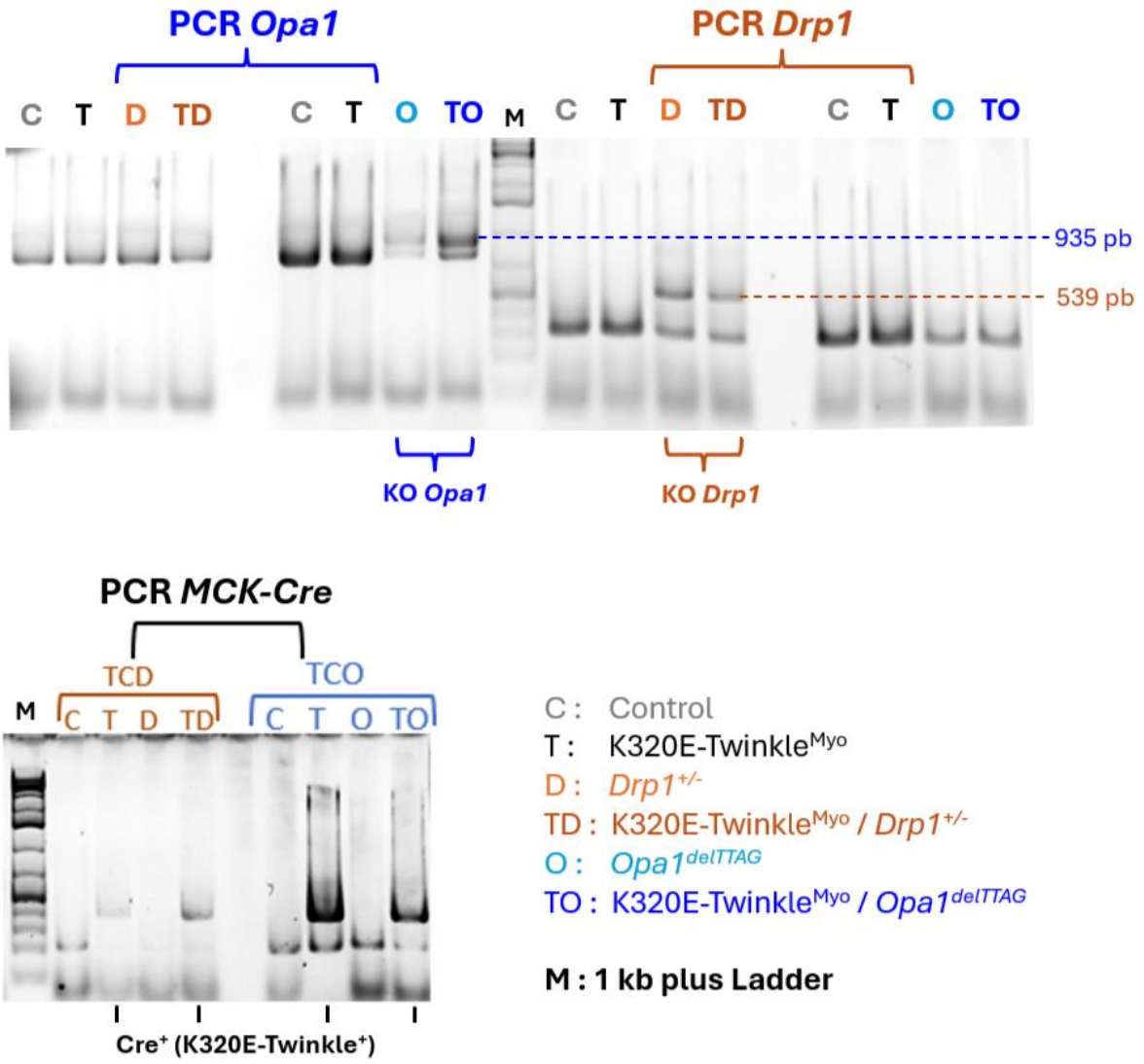


Figure 55 : Migration des produits de la PCR de génotypage à partir des cœurs de souris sur gel d'agarose

Les bandes de plus hautes tailles moléculaires correspondent aux amplifications des séquences mutées. TCD et TCO sont les acronymes correspondants respectivement aux croisements : K320E-Twinkle-Cre X *Drp1*$^{+/-}$ et K320E-Twinkle-Cre X *Opa1*^{delTTAG}.

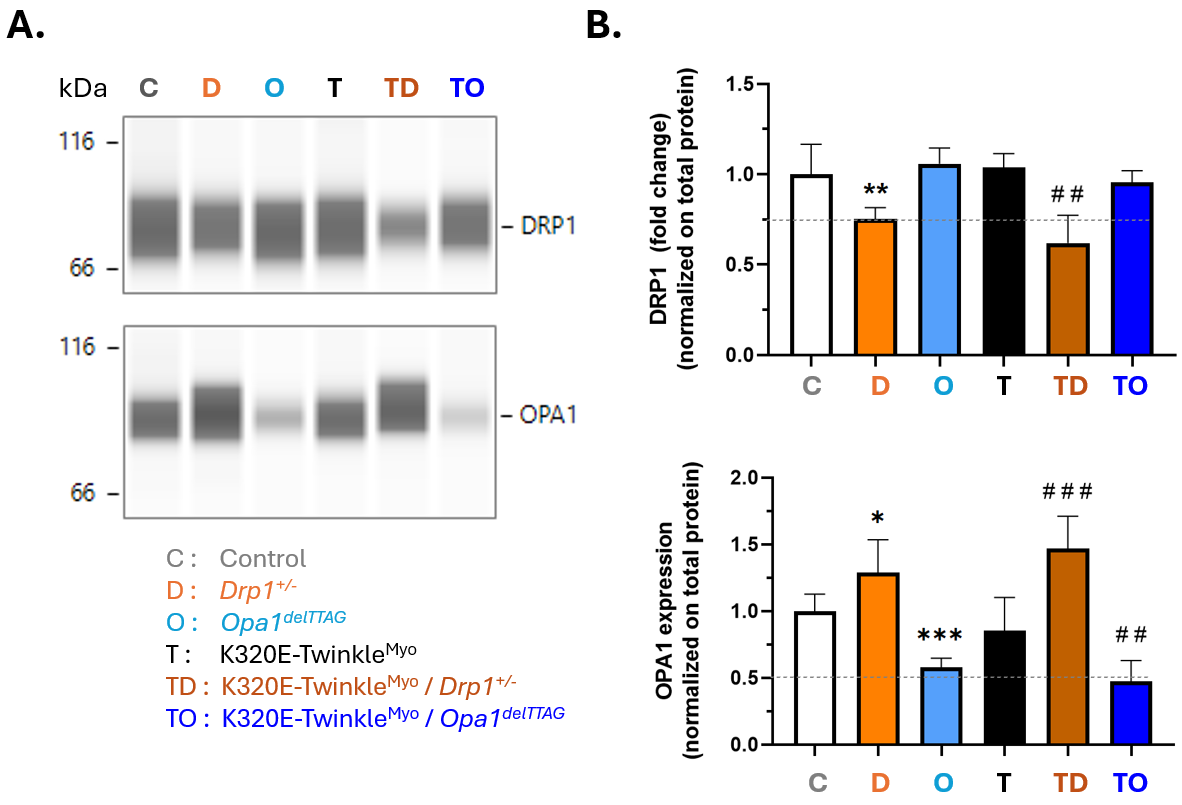


Figure 56 : Validation des modèles d'altérations de la dynamique chez K320E-Twinkle^{Myo} par semi-quantification des protéines OPA1 et DRP1 dans les cœurs de souris de 18 mois par Simple Western®

A) Signal généré par le système Jess® de Simple Western®, proportionnel à la quantité de protéines OPA1 et DRP1 contenues dans les échantillons analysés. **B)** Normalisation du signal de chaque protéine analysée par Jess® avec celui des protéines totales, sur 6 échantillons indépendants.

3.1.1.3. Les souris des 6 génotypes utilisés ne présentent pas de différence de poids corporel, ni d'hypertrophie cardiaque à 18 et 24 mois

Précédemment, il avait été montré que les souris K320E-Twinkle^{Myo} ne présentent pas d'hypertrophie cardiaque à 18 mois.[8] Afin de déterminer si la conjonction des mutations de *Twnk* et *Opa1* ou *Drp1* a un impact sur ce paramètre, le poids des souris âgées de 18 ou 24 mois et celui de leurs cœurs ont été notés à chaque sacrifice. Une analyse du poids corporel seul peut en outre permettre de déceler un impact global des mutations sur l'animal (perte d'appétit, dépression). Nous avons à nouveau utilisé le ratio poids du cœur sur poids du corps pour détecter une éventuelle hypertrophie cardiaque. Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les 6 génotypes analysés (**Figure 60**). De plus, aucun phénotype comportemental particulier n'a été observé chez ces animaux, ni une mortalité précoce.

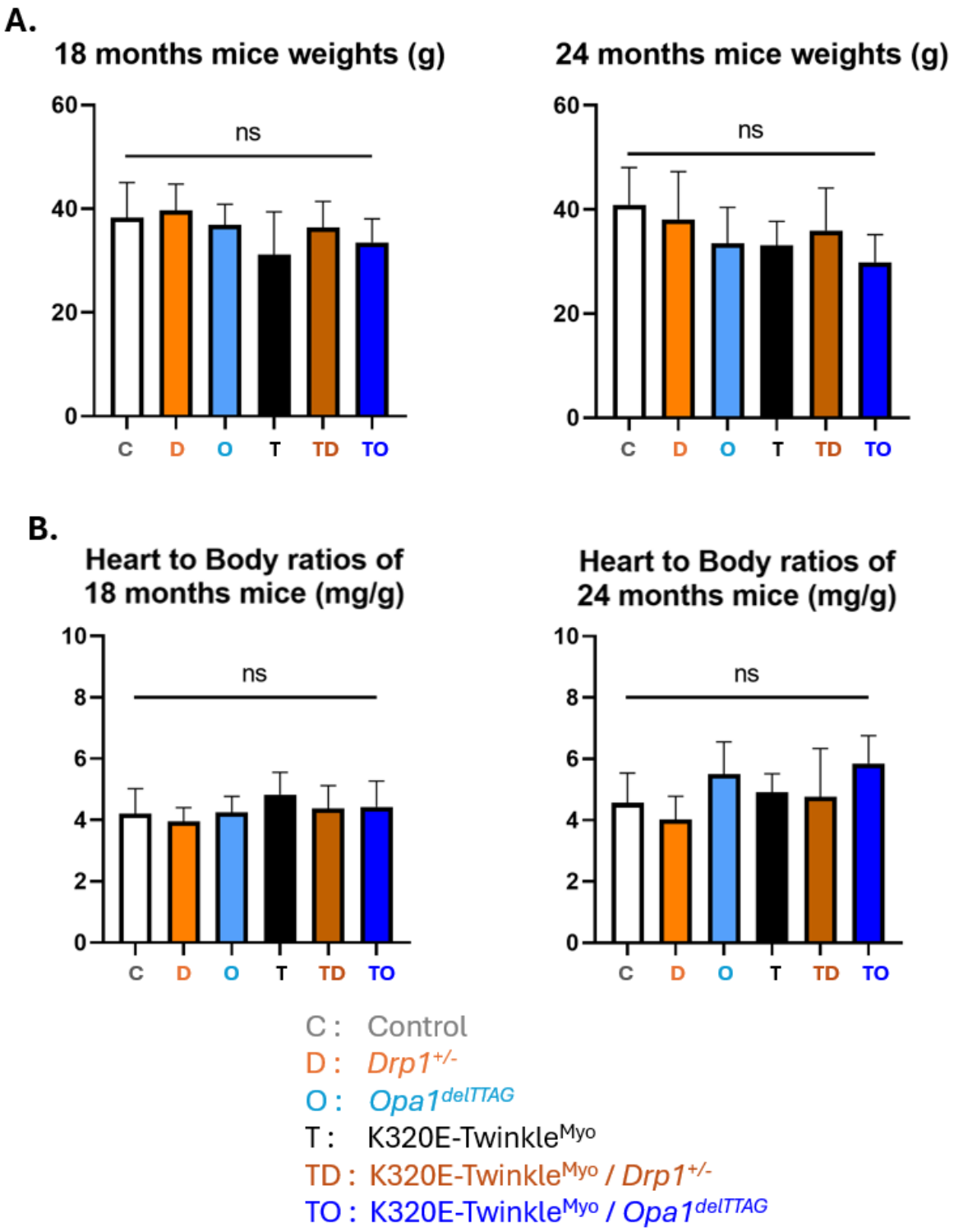


Figure 57 : Impact des mutations des modèles murins sur le poids du corps et du cœur

A) Poids des souris en gramme, en fonction de leur génotype à 18 mois (à gauche) et à 24 mois (à droite). n = 3-10. **B)** Rapports des poids du cœur sur le poids du corps des souris en mg/g, en fonction de leur génotype à 18 mois (à gauche) et à 24 mois (à droite). n = 3-10.

3.1.2. La dynamique mitochondriale ne module pas la quantité d'ADNmt ou de délétions dans le cœur et les muscles de K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois

Afin de déterminer l'impact de l'altération de la fusion ou de la fission sur la maintenance et l'intégrité de l'ADNmt chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}, nous avons quantifié le nombre de copies d'ADNmt et des 3 larges délétions A, B et C sur de l'ADN total extrait des cœurs des différents modèles (**Figure 58**). Nous avons en outre vérifié ces paramètres dans plusieurs muscles afin de consolider les résultats obtenus dans le cœur.

Conformément à nos attentes, le nombre total de copies d'ADNmt dans les cellules du cœur n'est pas affecté par la mutation K320E-Twinkle ou les altérations de la dynamique mitochondriale, et c'est également le cas dans les muscles squelettiques.

De manière surprenante, nous n'avons pas observé de différences significatives entre les pourcentages de copies d'ADNmt présentant une des délétions A (9089-12976), B (9554-13299) ou C (1100-4934), décrites par Tanhauser et Laipis en 1995[81], que ce soit dans le cœur ou les muscles. Il est intéressant de noter que si chez l'homme, les larges délétions se concentrent majoritairement dans l'arc majeur[77,290], chez nos souris c'est la délétion C, située sur l'arc mineur, qui est plus largement représentée que les autres (**Figure 59 A**).

Face à ce résultat, nous avons émis l'hypothèse que cette absence de différence dans le taux de délétions chez les animaux pouvait être due au fait que nous ne nous concentrions que sur 3 délétions ciblées. Ainsi, afin d'avoir le panel complet des altérations de l'ADNmt chez nos animaux, nous avons réalisé un séquençage de type NGS sur une librairie de fragments d'ADNmt générée à partir de l'ADNmt extrait des cœurs de souris de 18 mois de la cohorte OPA1 (C, T, O et TO). Les résultats du séquençage sont représentés sous forme de « circos », des représentations graphiques de l'ADNmt avec des arcs de cercles indiquant les parties réarrangées (**Figure 59 C**). Ces représentations sont obtenues grâce au logiciel Eklipse développé au sein de notre laboratoire289 et qui, en plus de la visualisation, permet de quantifier ces réarrangements de l'ADNmt (**Figure 59 D**). Cette quantification se visualise sur le circos par l'intensité des arcs de cercles. Il est intéressant de constater que, via cette technique, aucune délétion n'est détectée chez les contrôles mais qu'une quantité non négligeable est détectée dans les tissus de souris *Opa1*^{delTTAG}, même si elle n'atteint pas les taux de réarrangements des animaux K320E-Twinkle^{Myo} et K320E-Twinkle^{Myo} *Opa1*^{delTTAG} qui sont bien plus importants.

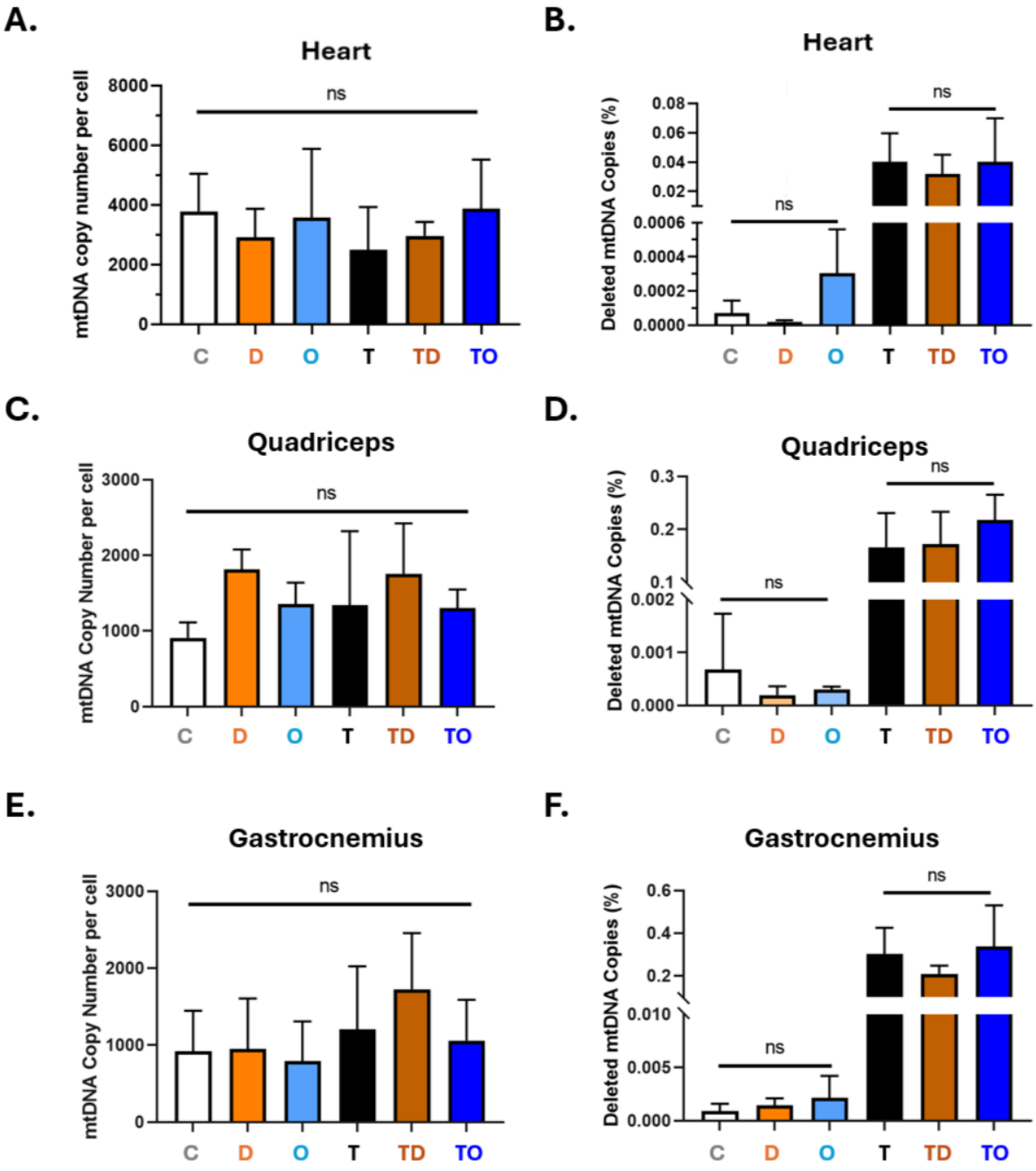


Figure 58 : Impact quantitatif et qualitatif de la modulation de la dynamique mitochondriale sur l'ADNmt chez K320E-Twinkle^{Myo}

Quantifications du signal fluorescent dû au SYBR® Green après amplification de séquences ADN par qPCR dans les tissus de souris de 18 mois. **A), C), E)** Quantifications des copies d'ADNmt par cellule, réalisée respectivement dans le cœur, le quadriceps et le gastrocnémien des différentes souris à 18 mois. Les valeurs Cq du signal de la qPCR de 12S (sous unité ribosomale mitochondriale) ont été normalisées sur celle de B2M (gène de ménage nucléaire). Le résultat est multiplié par deux pour obtenir le nombre de copies par cellules et non par allèles. **B), D), F)** Quantifications des copies d'ADNmt présentant les délétions A, B ou C décrites précédemment, respectivement dans le cœur, le quadriceps et le gastrocnémien des différentes souris à 18 mois. Les valeurs Cq du signal de la qPCR des séquences résultant d'une délétion ont été normalisées sur celle de la D-loop (zone contrôle car origine de réplication de l'ADNmt). n = 3-9.

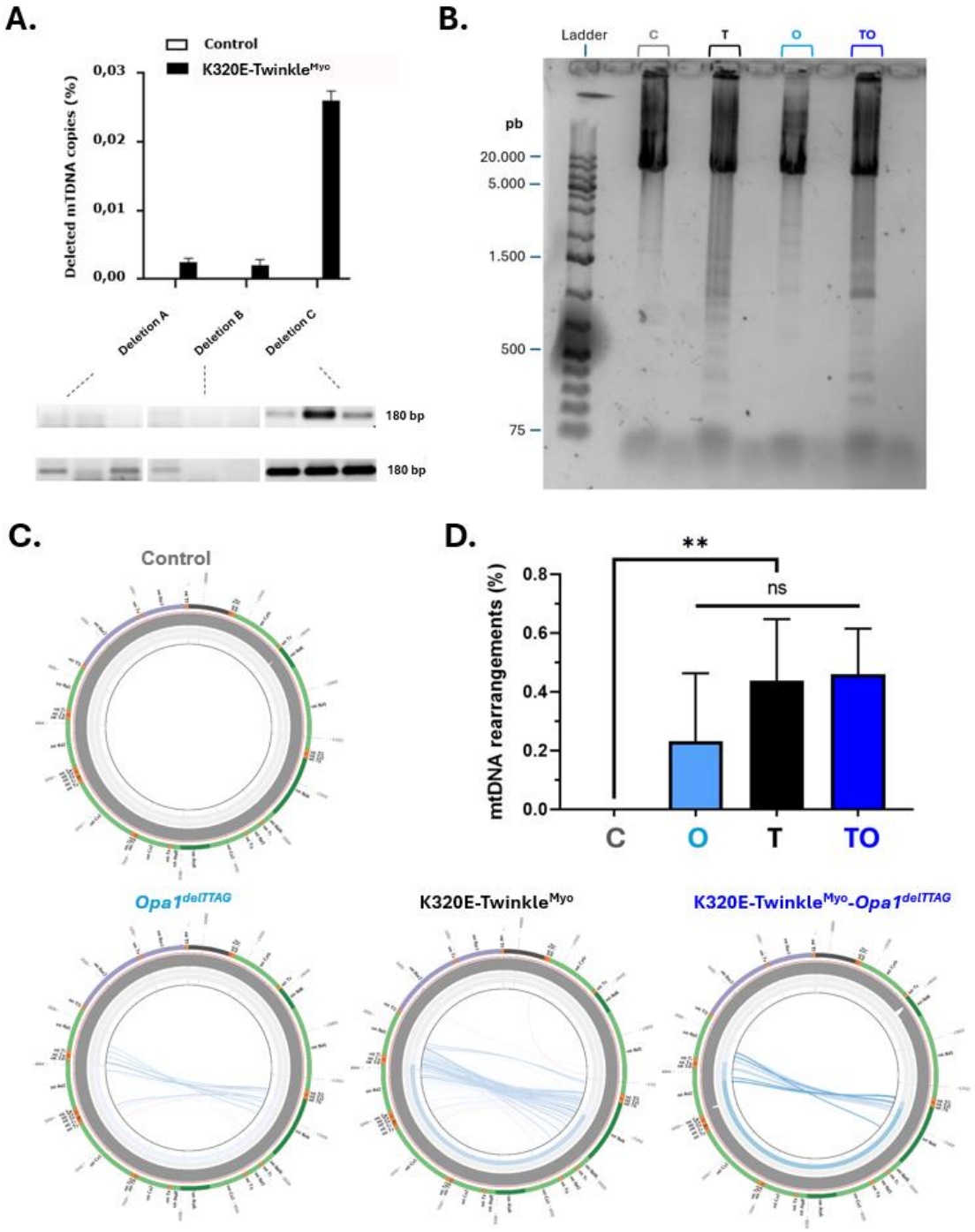


Figure 59 Analyse des délétions de l'ADNmt chez les souris de 18 mois

A) Quantification des 3 délétions ciblées dans le cœur des animaux contrôles et K320E-Twinkle^{Myo}. Les résultats sont présentés séparément pour chaque délétion, la C est la plus représentée. En dessous, la révélation d'un gel d'agarose dans lequel les produits d'amplification de ces 3 délétions après PCR classique ont migré, est présentée, à titre illustratif. n = 3. **B)** Révélation d'un gel dans lequel ont migré les produits d'une PCR demi-longue avec les amorces DL1 sur un échantillon de chaque génotype de la cohorte de souris OPA1 (C, O T, et TO). **C)** Circos représentatifs des résultats obtenus par séquençage NGS des copies d'ADNmt de la cohorte OPA1 à 18 mois, générés grâce au logiciel Eklipse™. Les segments des copies d'ADNmt ayant subis de larges réarrangements sont représentés en bleu. L'intensité des arcs de cercle témoigne de leur quantité dans les homogénats de cœurs. **D)** Représentation graphique des quantifications des réarrangements de l'ADNmt dans les cœurs de souris de 18 mois. n = 4-6.

La migration sur gel de produits d'amplification d'échantillons d'ADNmt de cette cohorte par PCR demi-longue montre bien le même pattern (**Figure 59 B**). De manière intéressante, la variété des délétions semble moins importante chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG} que chez les K320E-Twinkle^{Myo}. Toutefois, le séquençage NGS confirme l'absence de différence significative entre le pourcentage de copie d'ADNmt présentant une délétion chez ces deux types de souris à 18 mois, en accord avec les résultats obtenus sur les délétions A, B et C par qPCR.

3.1.3. L'haploinsuffisance en protéine OPA1 entraîne une accumulation accrue de cardiomyocytes et myocytes COX-déficients chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois

Nos résultats précédents montrent que la diminution de l'expression protéique d'OPA1 et de DRP1 n'a pas d'impact sur l'accumulation d'altérations de l'ADNmt chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}. Néanmoins, nous avons cherché à déterminer si ces modulations d'expression d'acteurs majeurs de la dynamique mitochondriale avaient un impact sur l'accumulation de cardiomyocytes COX-déficients, en utilisant la coloration COX/SDH. Celle-ci permet d'observer en brun l'activité de la COX, le 4ème complexe de la chaîne respiratoire (CR), situé en aval de celle-ci, témoignant donc de sa fonctionnalité générale. Si le seuil critique d'hétéroplasmie est franchi (60 % pour les délétions), l'ADNmt ne sera plus d'assez bonne qualité pour coder correctement les 13 sous-unités des complexes de la CR et la coloration n'aura pas lieu, laissant place à la seconde, celle de la SDH, 2ème complexe de la CR, codé uniquement par l'ADN nucléaire et donc non affecté par les mutations/délétions de l'ADNmt. Cette seconde coloration marque les cellules COX^{-} en bleu. Un marquage COX/SDH a donc été effectué sur des coupes de cœur (**Figure 60 A**) chez les différentes souris présentant ou non les mutations K320E-Twinkle^{Myo}, *Drp1*$^{+/-}$ et *Opa1*^{delTTAG}. Le modèle K320E-Twinkle^{Myo} offrant l'opportunité de voir l'impact de la mutation également dans les muscles, des coupes de gastrocnémien, tibial antérieur et soléaire ont également été colorées, celles du soléaire sont présentées en annexe (**Figure 82**). Conformément à nos attentes, les souris contrôle présentent des taux négligeables de cardiomyocytes COX^{-} à 18 mois, et il en est de même pour les souris *Opa1*^{delTTAG} et *Drp1*$^{+/-}$ (**Figure 60 B**).

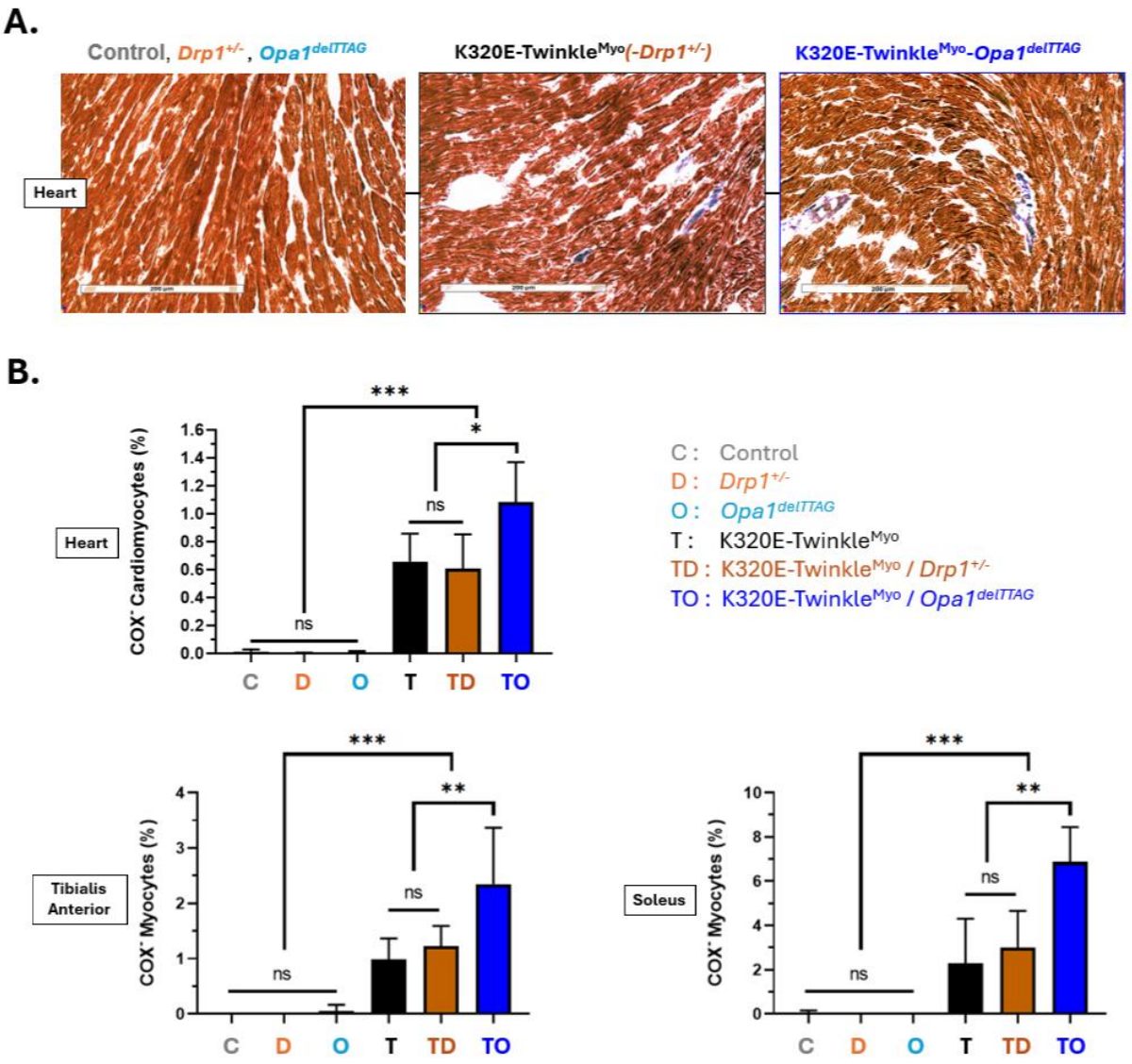


Figure 60 : Impact de la modulation de la dynamique mitochondriale sur la COX-déficience des cardiomyocytes et myocytes des souris K320E-TwinkleMyo de 18 mois

Observations au microscope optique, représentatives des différents génotypes de souris, de coupes de cœur ayant subi une coloration COX/SDH. **B)** Quantification des pourcentages de cardiomyocytes et myocytes COX^- dans les tissus des différentes souris. Le comptage a été rapporté sur l'aire de chaque section correspondante puis sur le nombre moyen de cellules par μm^2 (0.225) et enfin multiplié par deux dans le cadre du cœur, en considérant que la population de CM représente environ la moitié des cellules du cœur. n = 4-12.

De même, nous retrouvons 0,6 % de cellules COX^- dans le cœur des souris K320E-TwinkleMyo, en accord avec notre estimation précédente.8 Les souris K320E-TwinkleMyo-*Drp1*$^{+/-}$, quant à elles, présentent un taux de cellules COX^- similaire aux souris K320E-TwinkleMyo, montrant que la perte d'un allèle de Drp1 n'a pas d'influence sur ce paramètre. A l'inverse, nous avons observé un nombre 1.6 fois plus important de cardiomyocytes COX^- chez les individus K320E-TwinkleMyo-*Opa1*^{delTTAG} de 18

mois, en comparaison avec les autres animaux porteurs de la mutation K320E-Twinkle. Ces résultats se confirment tous au niveau des muscles tibial antérieur et soléaire, avec environ 2 fois plus de myocytes COX^- chez les animaux K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG}, montrant ainsi que ce phénomène n'est pas cœur-spécifique. Ces observations contrastent avec l'absence d'impact sur les taux de délétions de l'ADNmt, mais suggèrent malgré tout un rôle protecteur de la fusion médiée par OPA1 sur l'accumulation âge-dépendante de cellules déficientes en activité mitochondriale.

3.1.4. Impact de l'haploinsuffisance en protéine OPA1 sur les arythmies cardiaques des souris K320E-Twinkle^{Myo}

Les travaux précédents sur les souris K320E-Twinkle^{Myo} ont montré qu'elles développent des arythmies ventriculaires à l'âge de 18 mois, en particulier en situation de stress (nage forcée), avec 5 fois plus de contractions ventriculaires prématurées (CVP) et 3 fois plus de blocs atrio-ventriculaire (BAV) que les souris contrôles.[8] De plus, les résultats obtenus montraient un effet de seuil critique de proportion de cellules COX-déficientes pour la survenue de ces arythmies, puisqu'à 12 mois, avec 3 fois moins de cellules COX^- (1 cellule sur 600), il n'y avait pas de différences avec les souris contrôles. Etant donné que l'invalidation mono-allélique d'*Opa1* entraîne un doublement de la proportion de cellules COX^- chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}, nous émettons l'hypothèse que les arythmies ventriculaires sont plus fréquentes chez les double mutants K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG}. A cette fin, des souris contrôles, K320E-Twinkle^{Myo} et K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG} âgées de 18 mois ont subi l'implantation de puces ETA-F10 (DSI) pour suivre leur rythme cardiaque en situation de repos sur 24h et 10' de stress, comme précédemment. L'analyse des traces ECG obtenues a été confiée à l'équipe du docteur Thomas Beiert (Bonn, Allemagne) et à ce jour nous n'avons pas encore les résultats définitifs. Toutefois, un premier examen des ECG montre qu'il n'y pas de différences entre les fréquences cardiaques chez tous nos animaux testés (**Figure 61 A**), ce qui était le cas précédemment, avec des valeurs aux alentours de 600 bpm.[8] Nous avons observé des portions d'ECG montrant un rythme régulier sans anomalies (**Figure 61 B**) chez les 3 types de souris, mais également des évènements d'arythmies de type BAV et CPV chez les mutants confortant davantage les résultats obtenus en 2015. Bien qu'il faille attendre les résultats définitifs pour pouvoir conclure, nos observations suggèrent que ces évènements d'arythmies sont plus fréquents chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG} (**Figure 61 B**).

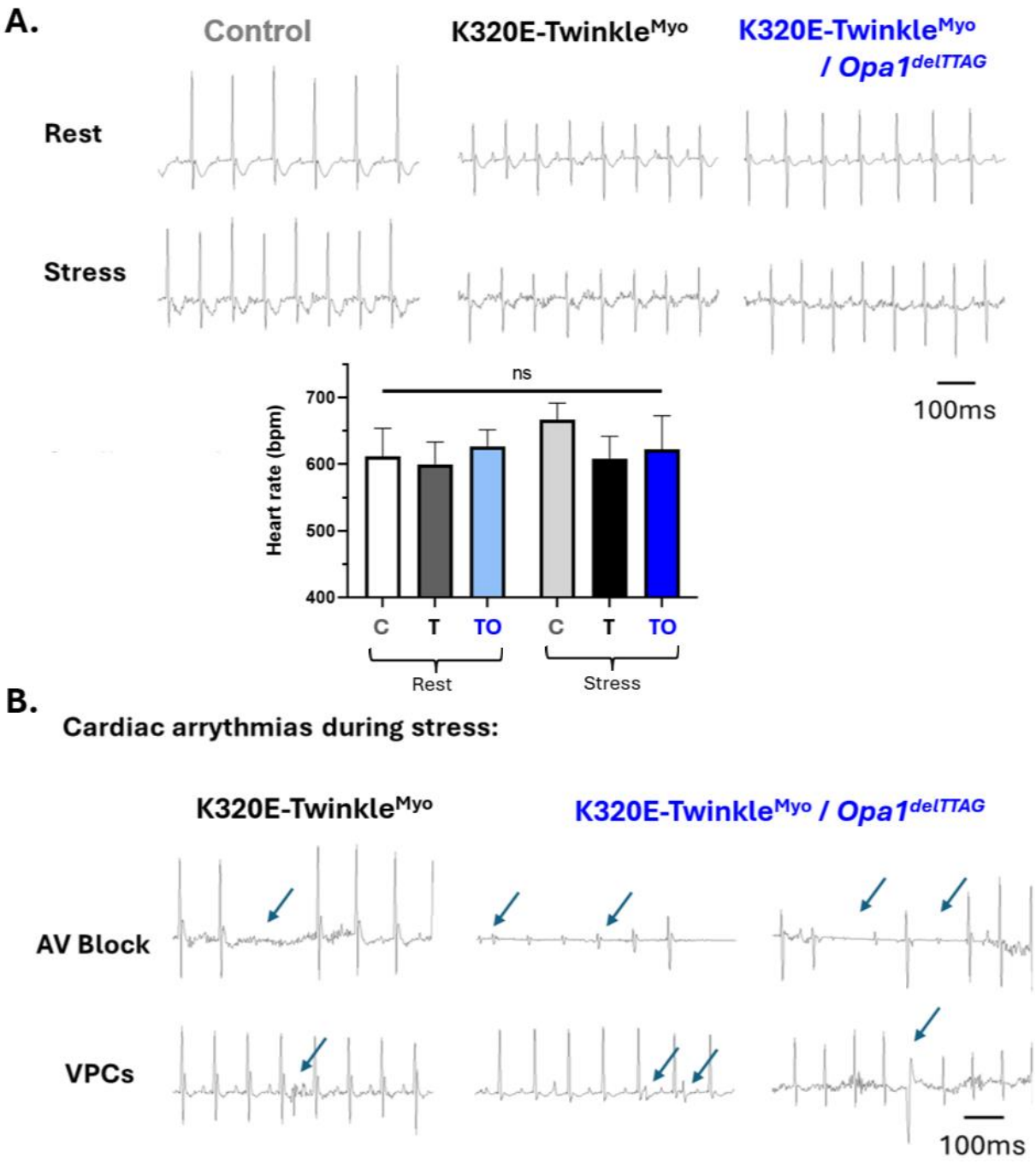


Figure 61 : ECGs caractéristiques des modèles de souris K320E-Twinkle^{Myo}, *Opa1*^{delTTAG} et double-mutants

A) Les ECG ont été enregistrés pendant 24 heures (repos) et pendant un test d'effort (10 minutes de natation) à d'implants de télémétrie (ETA-F10, DataSciences International) sur des souris contrôles, K320E-Twinkle^{Myo}, et des souris K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG}, toutes âgées de 18 mois. **B)** Pendant le stress, les souris K320E-Twinkle^{Myo} et K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG} développent des arythmies telles que des blocs auriculo-ventriculaires (BAV) et des contractions ventriculaires prématurées (CVP). n = 6.

3.2. Stimulation de la fusion mitochondriale par IP journalière de M1 fusion promoter

3.2.1. Effet du traitement au M1 fusion promoter sur le poids des animaux traités

Nos résultats précédents suggérant un rôle protecteur de la fusion mitochondriale, nous avons donc cherché à vérifier l'impact de sa stimulation sur l'accumulation de copies d'ADNmt, de cardiomyocytes COX^-, et la survenue d'arythmies cardiaques chez les souris K320E-$Twinkle^{Myo}$. Afin de stimuler pharmacologiquement la fusion mitochondriale, nous avons choisi d'utiliser le M1 fusion promoter[278], qui a déjà été utilisé *in vivo*, notamment dans des modèles de cardiopathie liée au diabète chez le rat.[291] En absence de données précises sur la stabilité de la molécule une fois resuspendue dans la solution véhicule, et dans l'optique de contrôler les doses administrées, nous avons opté pour un traitement par injection IP journalière sur une durée de 2 mois. En effet, l'implémentation de la molécule dans la nourriture des souris ne permet pas un contrôle des doses ingérées et les pompes osmotiques de type Alzet® nécessitent une stabilité de la drogue. Le traitement au M1 a été donné de 16 à 18 mois pour investiguer son éventuel rôle préventif sur le développement d'arythmies cardiaques, ainsi que de 22 à 24 mois pour évaluer son éventuel rôle curatif une fois les arythmies installées. 300 µg de la molécule ont été injectés de manière journalière afin de rester proche des rares itérations présentées dans la littérature[288,292] et de ne pas dépasser les 200 µL, volume maximum d'injection IP autorisé chez la souris.

L'injection intrapéritonéale (IP) journalière sur 2 mois n'est pas une manipulation anodine, surtout chez des animaux âgés et il a été important de vérifier la mortalité et le comportement des souris de manière quotidienne. Nous avons aussi pesé les souris tous les 3-4 jours. En effet, l'évolution du poids des souris est importante car elle reflète la santé générale de celles-ci, une diminution de 20 % du poids de corps indique un état pathologique pouvant être dû à un cancer, une anomalie du métabolisme, un refus de s'alimenter ou une dépression.

Nous n'avons pas observé de comportement particulier pendant la durée du traitement, ni d'isolement des souris qui pourrait traduire une souffrance. Les courbes de poids montrent qu'aux deux âges étudiés, le traitement n'a pas eu d'impact significatif, quel que soit le génotype, bien que nous ayons observé une tendance de perte de poids d'environ 5-10 % à 24 mois (**Figure 62**).

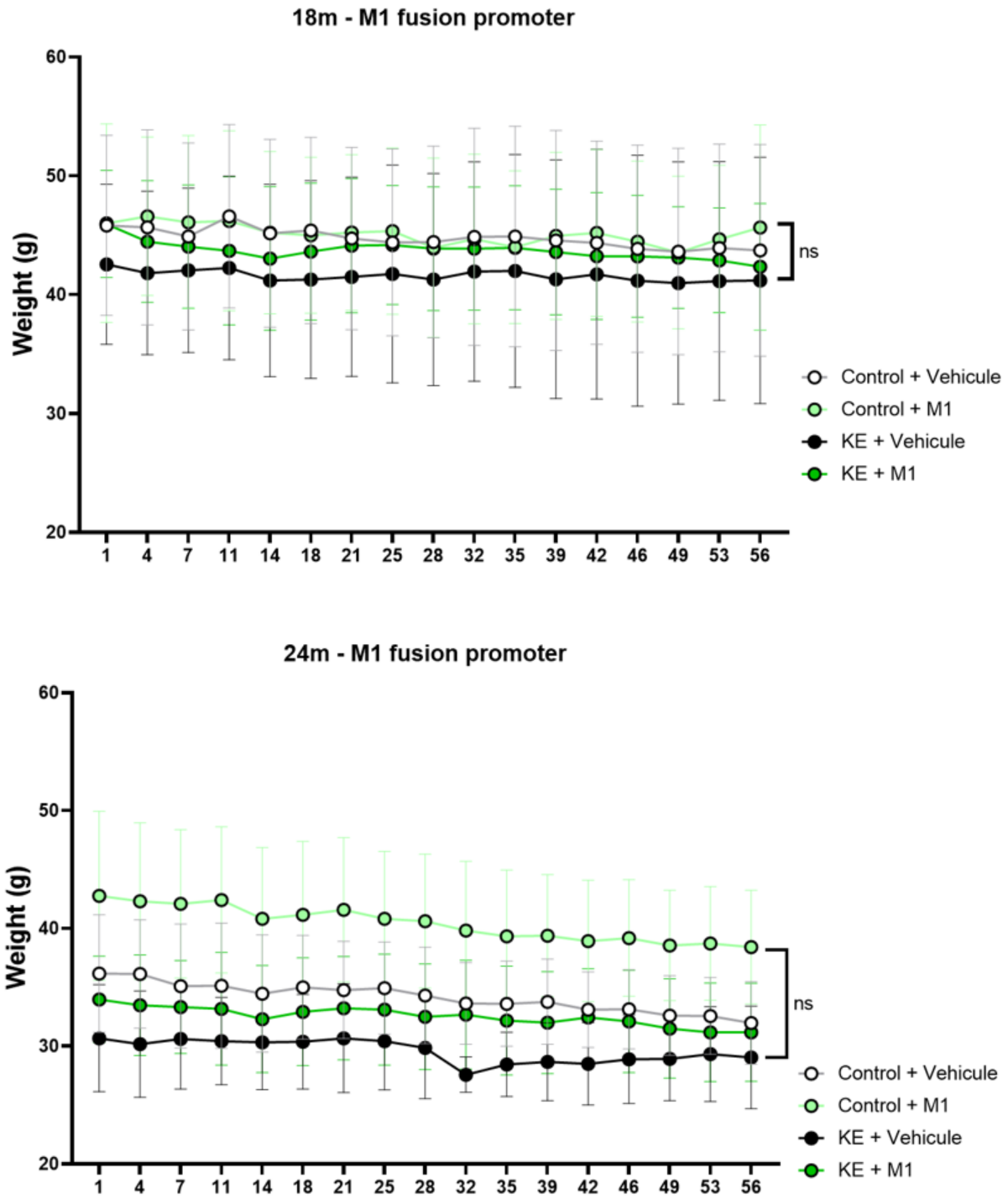


Figure 62 : Evolution du poids des souris lors du traitement au M1

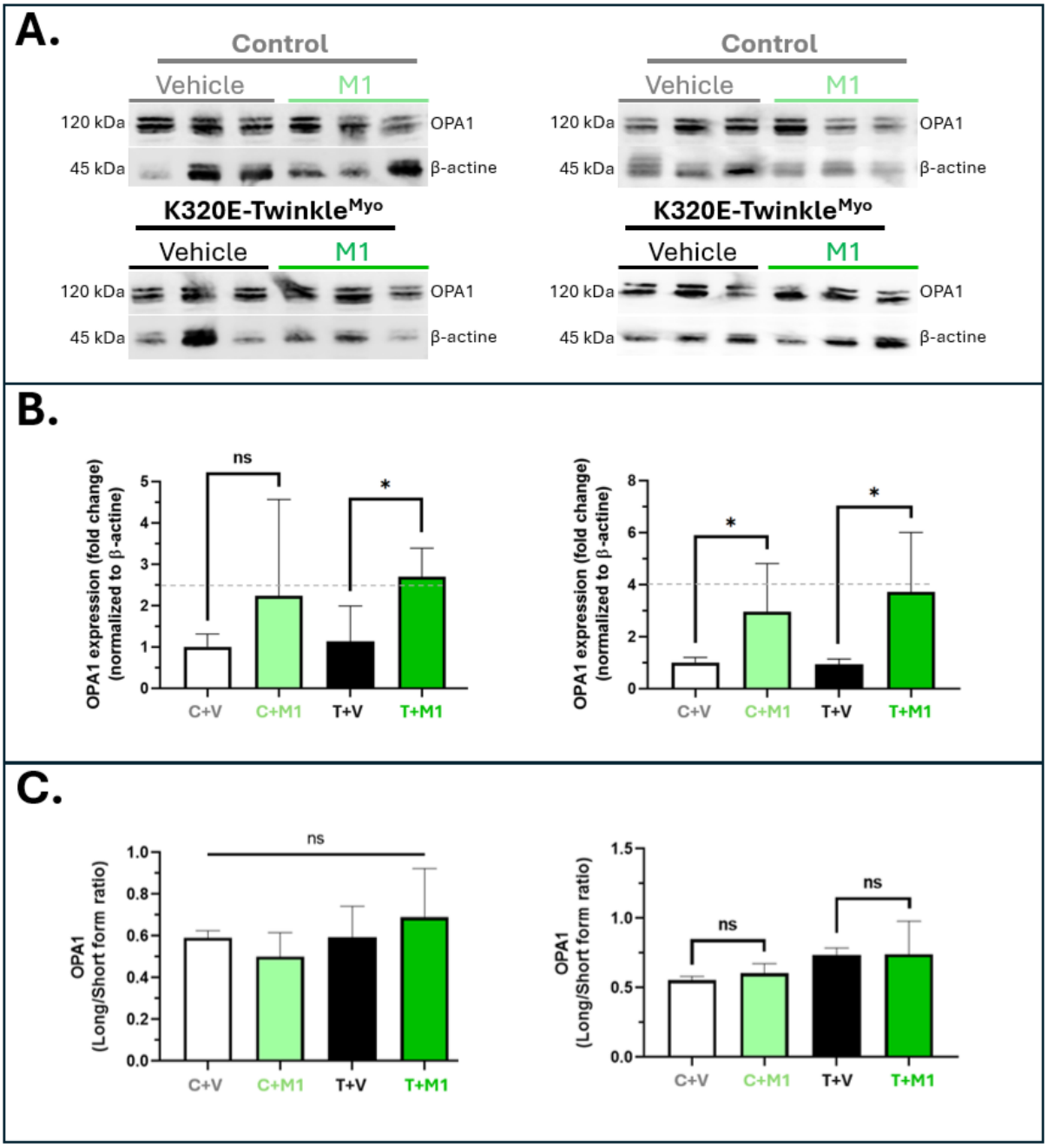
Les souris ont été pesées à la balance électronique deux fois par semaine durant les deux mois de traitement. Les poids des souris de 18 mois sont représentés en haut, ceux des souris de 24 mois en bas. n = 3-7.

Comme cette observation a également été faite chez les souris ayant reçu le véhicule, cela suggère qu'elle est liée cette solution, plutôt qu'à la molécule M1. Il est à noter qu'à 24 mois, les souris présentaient une grande disparité de poids, avec en particulier les souris contrôles traitées au M1 qui dépassaient globalement les 40 g. En termes de mortalité durant le traitement, 1 souris sur 22 est décédée avant d'atteindre les 18 mois et 4 sur 19 avant d'atteindre les 24 mois, dont 3 étant traités avec la solution contenant le M1. Les souris ont été autopsiées et aucune inflammation ou affection particulière n'a pu être observée sur le point d'injection ou dans les principaux organes internes. Il est toutefois difficile de conclure sur une quelconque nocivité du M1 fusion promoter ou de la solution véhicule car il est fréquent que les souris meurent de voie naturelle à un âge si élevé.

3.2.2. Le M1 fusion promoter stimule la production d'OPA1, sans impacter les proportions de formes courtes et longues

Afin d'évaluer l'impact du traitement au M1 fusion promoteur sur la fusion mitochondriale, nous avons cherché d'une part à évaluer la production d'OPA1 dans le cœur des souris traitées et, d'autre part, de définir si le traitement induit un déséquilibre des formes courtes et longues de la protéine. En effet, les isoformes d'OPA1 subissent constitutivement un clivage par YME1L, ou par OMA1 en condition de stress, et l'accumulation de formes courtes est un indicateur de la fragmentation du réseau mitochondrial.[117]

Les blots obtenus (**Figure 63 A**) ont permis d'établir que le traitement au M1, induit globalement une augmentation conséquente et significative de la quantité d'OPA1 dans le cœur des souris WT et K320E-Twinkle^{Myo} aux deux âges investigués, puisque nous avons observé entre 2,5 et 4 fois plus de protéine selon les génotypes (**Figure 63 B**). Par ailleurs, le traitement n'induit pas de clivage des formes longues d'OPA1, puisque les ratios des signaux de la forme non-clivée sur la forme clivée sont similaires chez les souris traitées avec la solution véhicule ou celle contenant le M1 (**Figure 63 C**).



C+V : Control + Vehicle solution
C +M1 : Control + M1 Solution
T+V : K320E-TwinkleMyo + Vehicle solution
T+M1 : K320E-TwinkleMyo + M1 Solution

Figure 63 : Impact du M1 fusion promoter sur la production d'OPA1 chez les souris WT et K320E-TwinkleMyo à 18 et 24 mois

A) Western blot représentatif réalisé avec des anticorps dirigés contre OPA1 et la β-actine (en haut). **B)** Quantification globale de la protéine OPA1 (formes courtes et longues confondues). **C)** Ratios forme longue sur forme courte d'OPA1. n = 6.

3.2.3. Le traitement au M1 n'influence pas le taux de délétions des copies de l'ADNmt dans le cœur et les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois

Nous avons ensuite cherché à déterminer si l'augmentation de la quantité de protéine OPA1 induite par le traitement au M1 fusion promoter avait un impact sur le taux de délétions de l'ADNmt chez les souris contrôles et mutantes. Dans cette optique, la technique de quantification par qPCR des délétions A, B et C précédemment décrites a été conservée. Les résultats ne montrent aucun impact significatif de la molécule M1 sur la quantité de ces 3 délétions aux deux âges investigués et chez les deux types de souris, dans le myocarde et dans le muscle gastrocnémien (**Figure 64**). Ces résultats, et ceux obtenus sur le modèle K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG} suggèrent fortement que le taux de délétions n'est pas influencé par la quantité de protéine OPA1 dans le contexte d'accumulation accélérée de délétions des souris K320E-Twinkle^{Myo} (**Figure 58**).

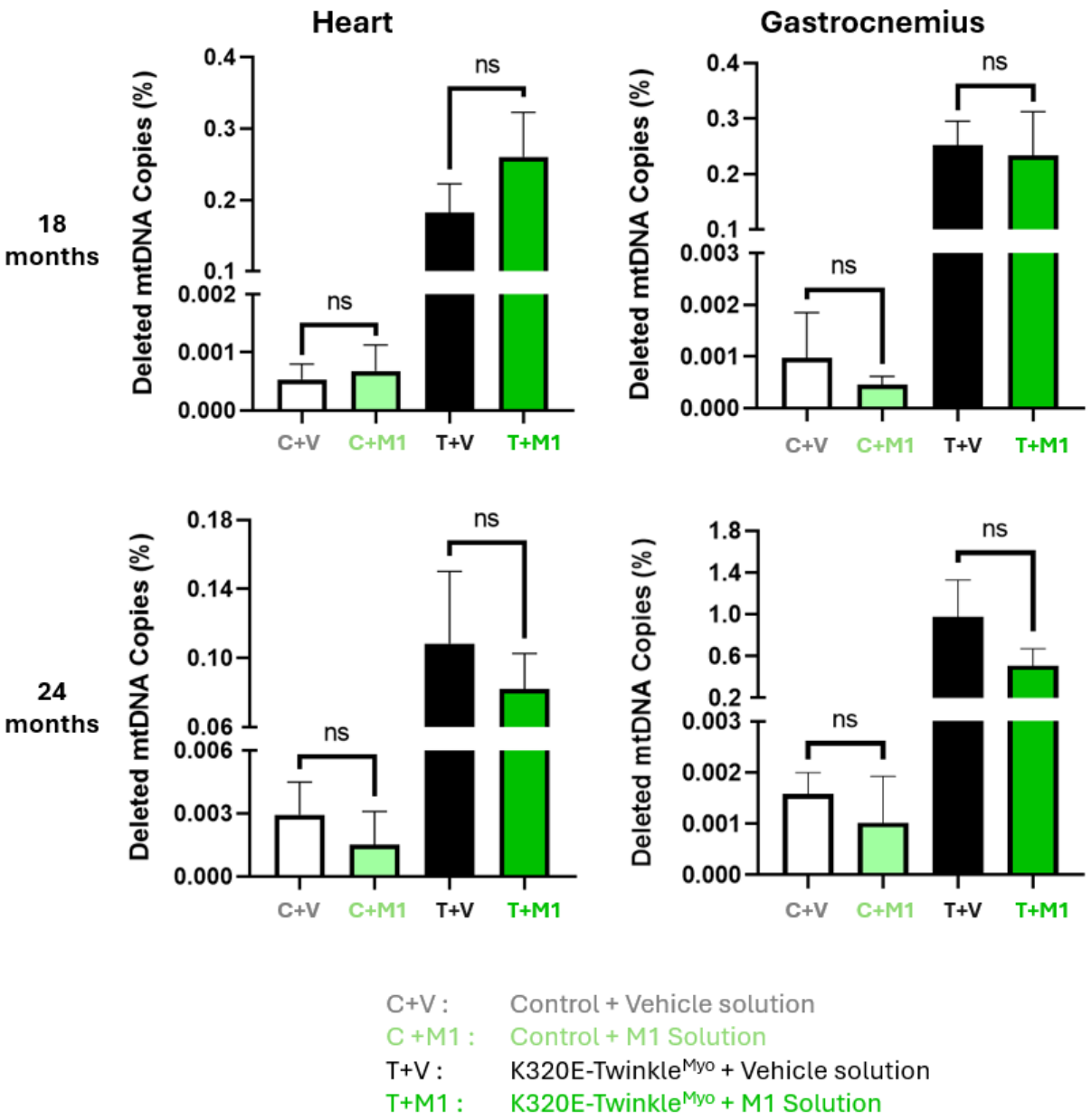


Figure 64 : Impact du M1 fusion promoter sur le taux de copie d'ADNmt présentant une délétion dans le cœur et les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois

Quantifications obtenues par normalisation des valeurs Cq du signal fluorescent issu de l'amplification des séquences d'ADNmt résultant des délétions A, B ou C sur celui de la D-loop. Les amplifications ont été effectuées sur de l'ADN total extrait **A)** de cœur et **B)** de gastrocnémien de souris Contrôles et K320E-Twinkle^{Myo} de 18 et 24 mois, après 56 jours d'injection IP journalière de 300 µg de M1 fusion promoter. n = 3-6.

3.2.4. Le M1 fusion promoter n'influence pas le taux de cardiomyocytes COX$^-$ dans le cœur de la souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois

Une série de coupes de cœurs des souris traitées ou non a ensuite subi une coloration enzymatique COX/SDH afin de déterminer si la molécule M1 a un impact sur le taux de cellules COX$^-$ dans ces tissus.

Ces colorations n'ont révélé aucune différence significative entre souris traitées et non traitées, qu'il s'agisse des souris contrôles ou mutantes à 18 et 24 mois. Une légère tendance à la diminution est observée pour les souris mutantes à 24 mois (-25 %), mais il faudrait renforcer ces résultats avec un plus grand effectif murin afin de voir si cela se confirme ou non.

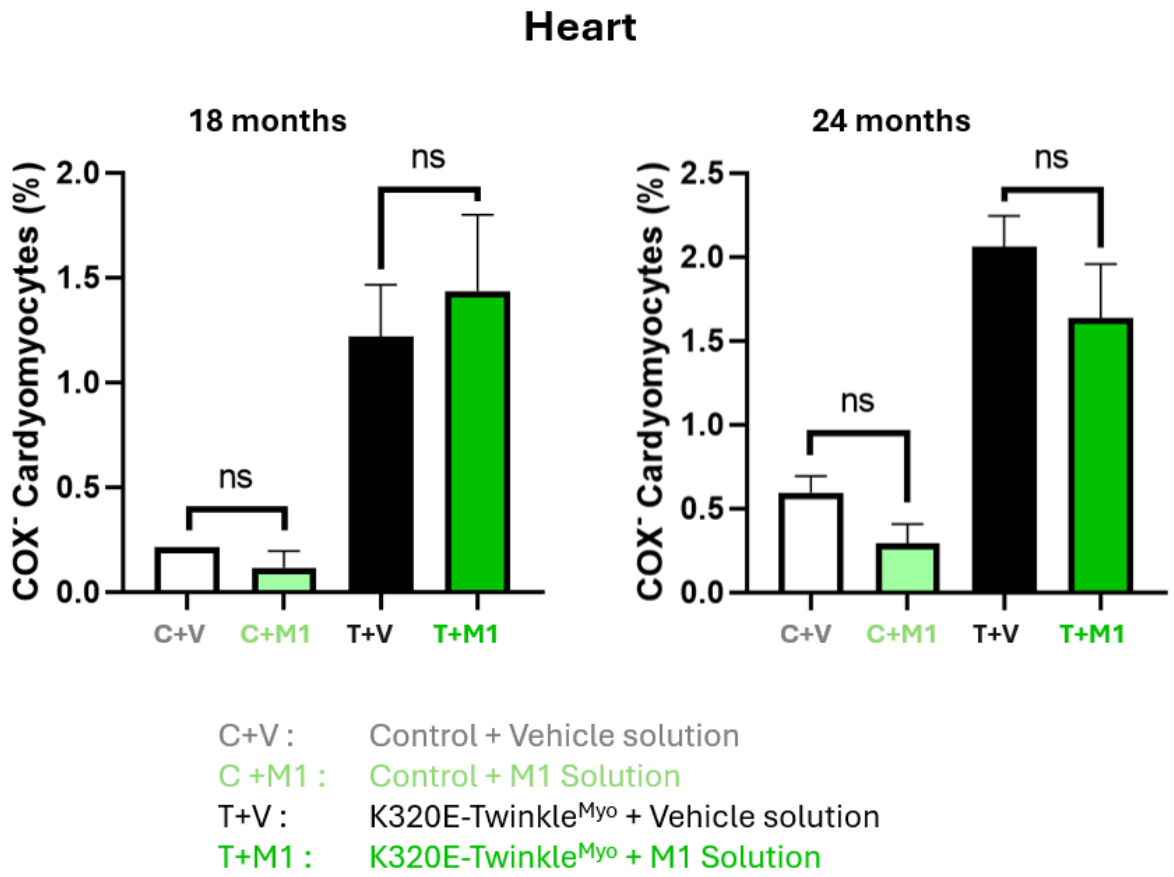


Figure 65 : Le M1 fusion promoter n'a pas d'impact significatif sur le taux de cardiomyocytes COX$^-$ chez K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois

Quantifications obtenues par comptage manuel des cellules COX$^-$ dont le résultat est rapporté au nombre de cardiomyocytes présents sur la coupe (environ 50%). Les comptages ont été effectuée sur des cryo-coupes de 10 µm de cœur de souris contrôles et K320E-Twinkle^{Myo} de 18 et 24 mois après 56 jours d'injection IP journalière de 300 µg de M1 fusion promoter. n = 3-6.

3.3. L'autophagie est plus forte dans le cœur des souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois mais s'agit-il de mitophagie ?

La deuxième approche pharmacologique que nous avons mise en place pour améliorer le phénotype des souris K320E-Twinkle^{Myo} est un traitement à l'urolithine A, qui est connue pour ses propriétés sur la longévité de plusieurs organismes, promeut la mitophagie et améliore le turnover mitochondrial.[293] Dans un premier temps, nous avons voulu caractériser l'état basal de la mitophagie dans le cœur de ces souris avant tout traitement. Dans cette optique, une semi-quantification de différentes protéines impliquée dans la mitophagie a été effectuée par Simple Western® ou western blot classique à partir d'extraits protéiques de cœurs de souris K320E-Twinkle^{Myo} ou contrôles de 18 mois (**Figure 66**).

La première de ces protéines est l'adaptateur LC3B-II, similaire à son précurseur LC3B-I mais sous une forme lipidée. Pour déterminer l'intensité de l'activité autophagique il est d'usage de comparer les ratios du signal de LC3B-II sur celui de LC3B-I[203], la conversion en forme lipidée étant intrinsèquement liée à l'autophagie. Selon ce principe, l'autophagie semble être 2 fois moins intense dans le cœur des souris K320E-Twinkle^{Myo}.

Cette tendance s'inverse avec l'immunoblot de p62 qui montre une diminution de cette protéine chez les souris mutantes (**Figure 66 A**). p62 est un adaptateur entre les agrégats de protéines ubiquitinées qui peuvent également être captées par les molécules de LC3B-II, et la membrane du phagophore via des protéines liées comme LC3B-II lui-même. L'analyse de l'activité de mitophagie via p62 fonctionne différemment de LC3B-II. Il est généralement considéré que si le signal en immunoblot est plus faible, alors la protéine a été dégradée par mitophagie. Or, les résultats obtenus avec cette interprétation suggèrent une mitophagie plus active, ce qui semble contraire à ce que les résultats sur LC3B suggèrent.

En parallèle, des cœurs de souris contrôles et K320E-Twinkle^{Myo} ont été perfusés avec une solution de collagénases afin d'isoler les cardiomyocytes pour observer des évènements d'autophagie/mitophagie à l'échelle de la cellule par marquages de protéines. Un triple marquage a été réalisé pour détecter les protéines LAMP2 (membrane du lysosome), VDAC1 (OMM) et LC3B (**Figure 66 B**). De manière frappante,

les souris K320E-Twinkle^{Myo} présentent des agrégats massifs de LC3B entourés de lysosomes. Malheureusement le marquage assez flou du réseau mitochondrial via VDAC-1 ne nous permet pas d'affirmer qu'il s'agisse de mitophagie.

C'est pourquoi nous avons évalué l'expression de PINK1 et Parkin, deux acteurs de la voie de mitophagie la plus décrite dans la littérature : la voie Parkin-dépendante. Cette voie découle du recrutement de PINK1 sur des membranes dépolarisées de mitochondries défaillantes via l'arrêt de son import pour protéolyse, ce qui induit son activité d'ubiquitination des protéines de l'OMM. Les chaînes d'ubiquitines permettent ensuite le recrutement de Parkin, un adaptateur de l'autophagosome. Cependant, les blots obtenus n'indiquent aucune différence significative de présence de ces deux protéines dans les lysats de cœurs de souris (**Figure 66**). Ceci peut s'expliquer par une activité autophagique non-dédiée à la mitochondrie ou, de manière plus plausible, par une mitophagie Parkin-indépendante.

En effet, il existe de nombreuses formes et voies de mitophagie, il est donc difficile d'affirmer la spécificité de l'autophagie observée sans passer les adaptateurs de la mitophagie Parkin-indépendante en Western Blot.[166,189]

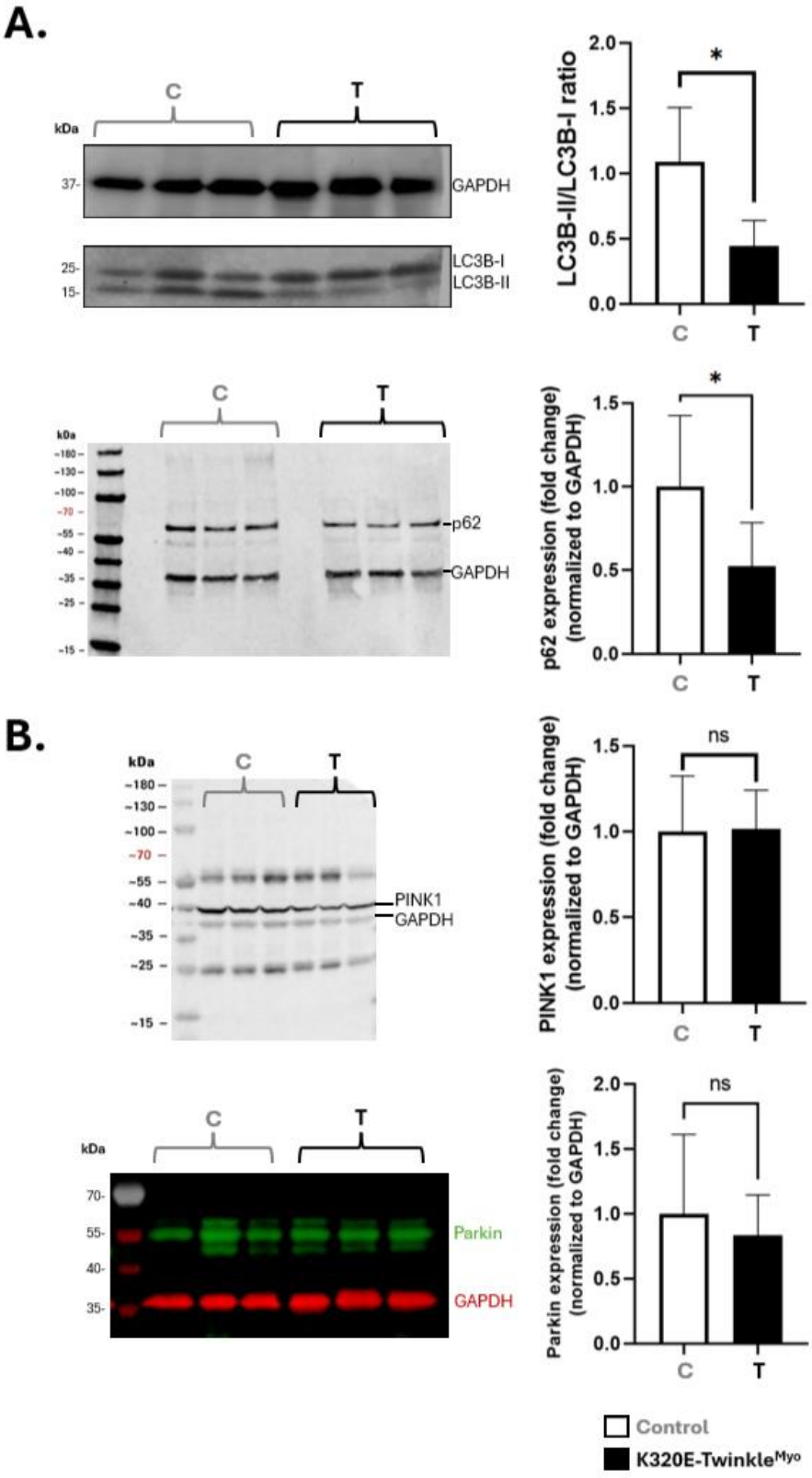


Figure 66 : Caractérisation de l'activité de la mitophagie basale chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}

A) Blots et quantification de l'expression des protéines de l'autophagie, LC3B (en haut) et p62 (en bas) par rapport à la GAPDH. n = 6. **B)** Westerns blots des protéines de la mitophagie Parkin-dépendante : PINK1 (en haut) et Parkin (en bas) et quantifications obtenues par normalisation au signal de la protéine de charge GAPDH. n = 6.

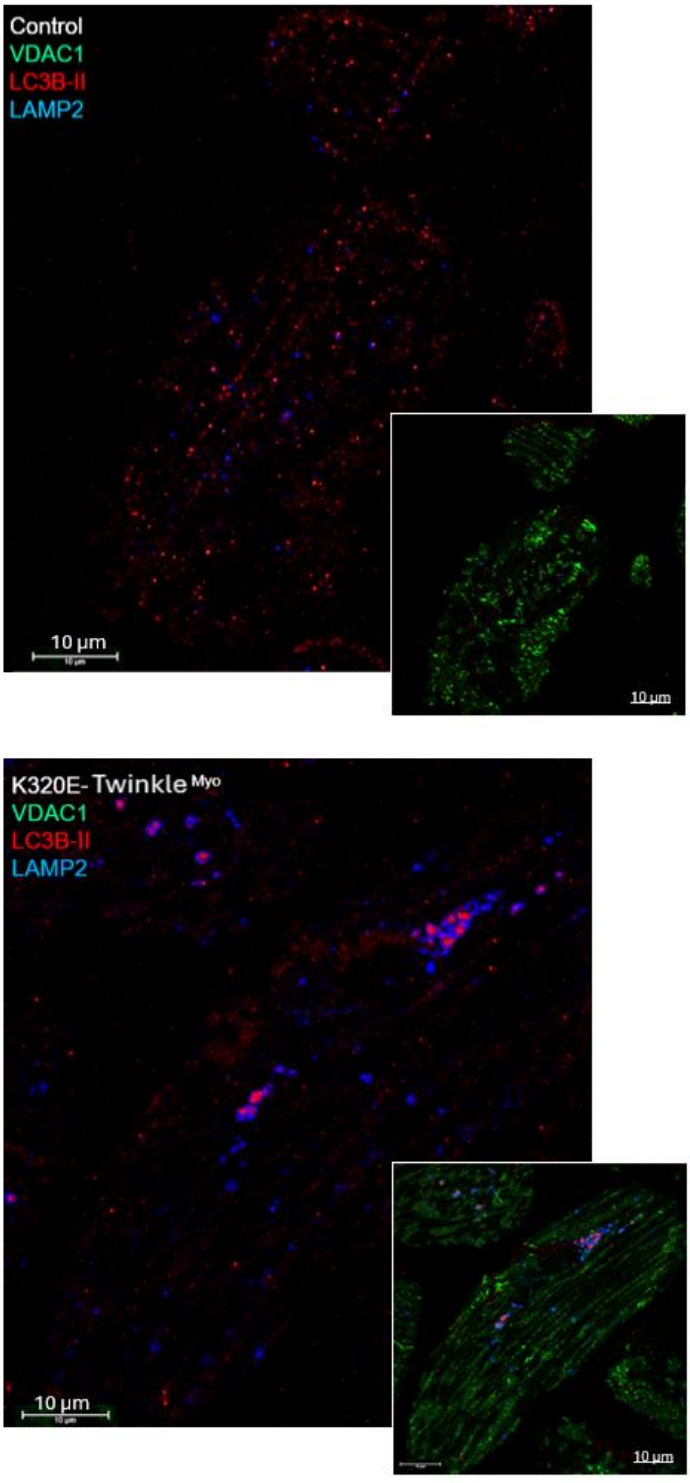


Figure 67 : Immunofluorescence de marqueurs de la mitophagie sur CM isolés de souris WT et K320E-Twinkle^{Myo} de 18 mois

Triple marquage de VDAC1 (OMM), LC3B (adaptateur de l'auto/mitophagie) et LAMP2 (lysosome) en immunofluorescence sur cardiomyocytes isolés de souris WT en haut et K320E-Twinkle^{Myo} en bas. Les images ont été obtenues sur microscope confocal à épifluorescence. Le marquage mitochondrial n'est représenté que sur des encarts en haut à gauche pour plus de visibilité des complexes LC3B-lysosomes.

3.4. Le traitement à l'Urolithine A (UA)

3.4.1. Le traitement à l'urolithine A n'a pas d'effet significatif sur le poids des animaux traités

Nos résultats précédents montrent que la mitophagie est exacerbée chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}, mais les agrégats massifs LC3B-LAMP2 observés pourraient signifier qu'elle n'est pas efficace et qu'elle est submergée face à l'accumulation continue de délétions de l'ADNmt. Afin de déterminer si l'urolithine A peut induire un turnover mitochondrial amélioré dans ce modèle, des souris contrôles et K320E-Twinkle^{Myo} ont été traitées durant 56 jours et de manière journalière avec 20 µg d'UA injectés en IP. La voie d'administration par IP a été choisie pour les mêmes raisons que pour la molécule M1 fusion promoter. Comme précédemment, nous avons vérifié la mortalité et le comportement des souris de manière quotidienne. Nous avons aussi pesé les souris tous les 3-4 jours.

Il n'y a aucune différence significative de poids entre les différents modèles de souris ayant été traitées avec la solution véhicule ou l'UA aux deux âges investigués (**Figure 68**). De même, aucun comportement particulier ou isolement n'a été observé chez ces animaux pendant la durée du traitement. Il est intéressant de relever que les souris K320E-Twinkle^{Myo} traitées avec la solution véhicule sont en moyenne plus grosses que les autres à 24 mois (**Figure 68**) sans qu'il y ait de corrélation directe avec le génotype (**Figure 57**).

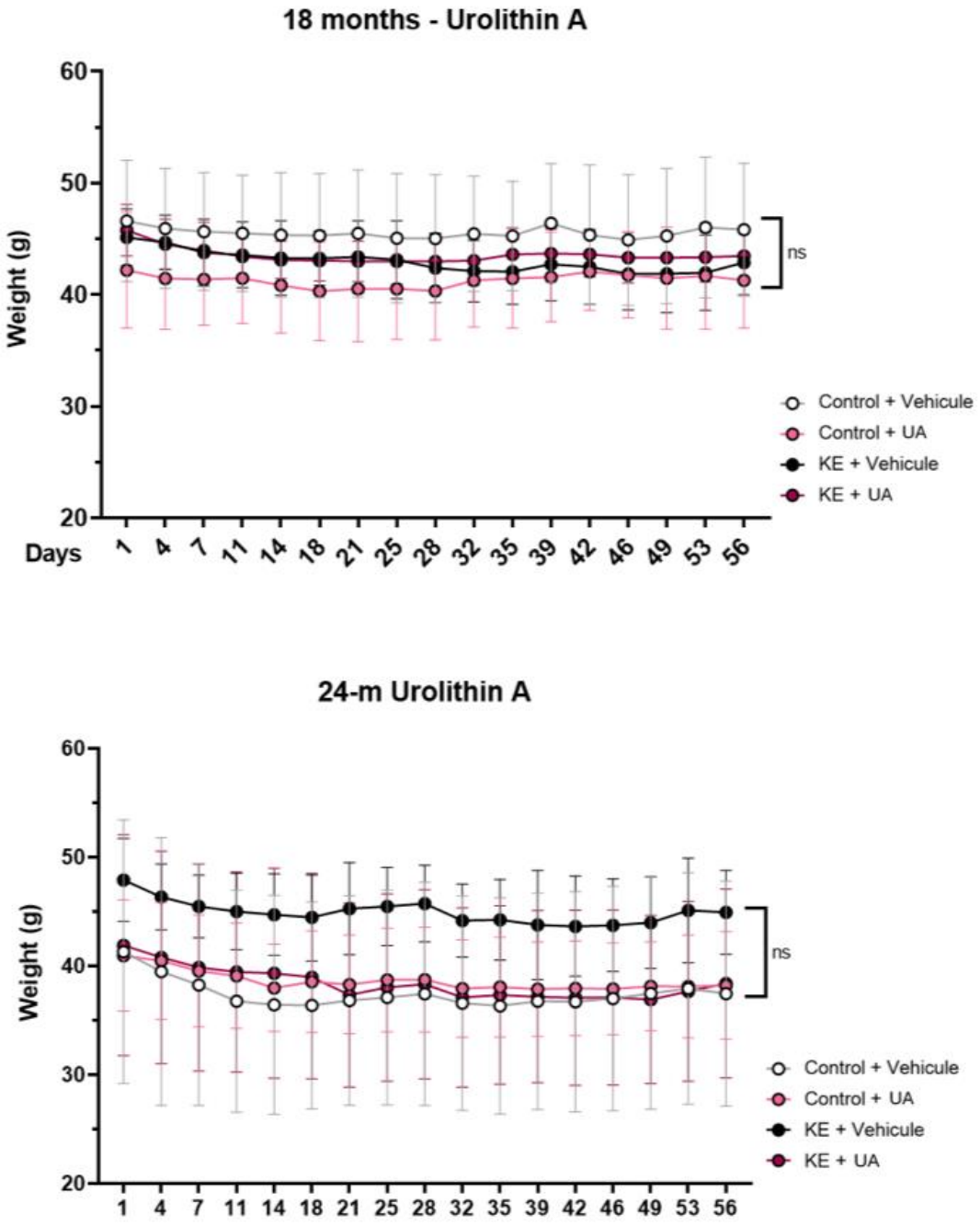


Figure 68 : Evolution du poids des souris lors du traitement à l'UA

Les souris ont été pesées à la balance électronique deux fois par semaine durant les deux mois de traitement. Les poids des souris de 18 mois sont représentés en haut, ceux des souris de 24 mois en bas. n = 3-7.

3.4.2. Impact de l'Urolithine A sur l'activité autophagique dans le cœur des souris contrôles et K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois

Nous avons ensuite réalisé une analyse des marqueurs protéiques impliqués dans l'autophagie et la mitophagie chez les souris contrôles et K320E-Twinkle^{Myo}, pour évaluer l'impact du traitement à l'urolithine A. Ainsi, nous observons, d'une part, une tendance à la dégradation de p62 chez les souris contrôles et mutantes traitées, même si cela n'est pas significatif, et d'autre part un doublement des ratios LC3B-II/LC3BI, ce qui implique un déblocage du flux autophagique et une autophagie accrue chez ces animaux (**Figure 69 A**). Par ailleurs, nous mettons en évidence une diminution significative des quantités de PINK1 et Parkin dans les tissus cardiaques des souris mutantes, avec une tendance similaire mais non significative chez les souris contrôles, indiquant que l'autophagie induite par l'UA est soit non sélective, soit sélective des mitochondries mais Parkin-indépendante.

3.4.3. L'UA n'influence pas le taux de délétions des copies de l'ADNmt dans le cœur ou les muscles squelettiques chez les souris K320E-TwinkleMyo à 18 et 24 mois

L'objectif principal du traitement des souris contrôles et K320E-Twinkle^{Myo} avec l'urolithine A était de stimuler la mitophagie et le renouvellement mitochondrial afin de réduire l'accumulation de délétions de l'ADNmt. L'exploration des taux de délétions A, B et C chez ces animaux à 18 et 24 mois n'a globalement pas montré de différences, à l'exception des souris contrôles de 24 mois qui voient leur taux de délétions diminuer après traitement à l'UA. Il est d'ailleurs intéressant de noter que chez ces souris contrôles, il y a systématiquement une tendance à la diminution du taux de délétions après traitement, que cela soit dans le cœur ou le muscle gastrocnémien. En revanche, pour les souris mutantes, aucune diminution ou tendance n'est observée (**Figure 70**). L'ensemble de ces résultats suggère qu'à la dose testée (20 µg), l'urolithine A permet l'élimination de délétions de l'ADNmt lorsqu'elles sont en faible proportion dans les cellules (souris contrôles), mais pas lorsqu'elles atteignent des taux trop élevés (souris mutantes). L'effectif de souris reste faible pour vraiment statuer sur ces résultats, et il conviendra d'en traiter de nouvelles pour les consolider.

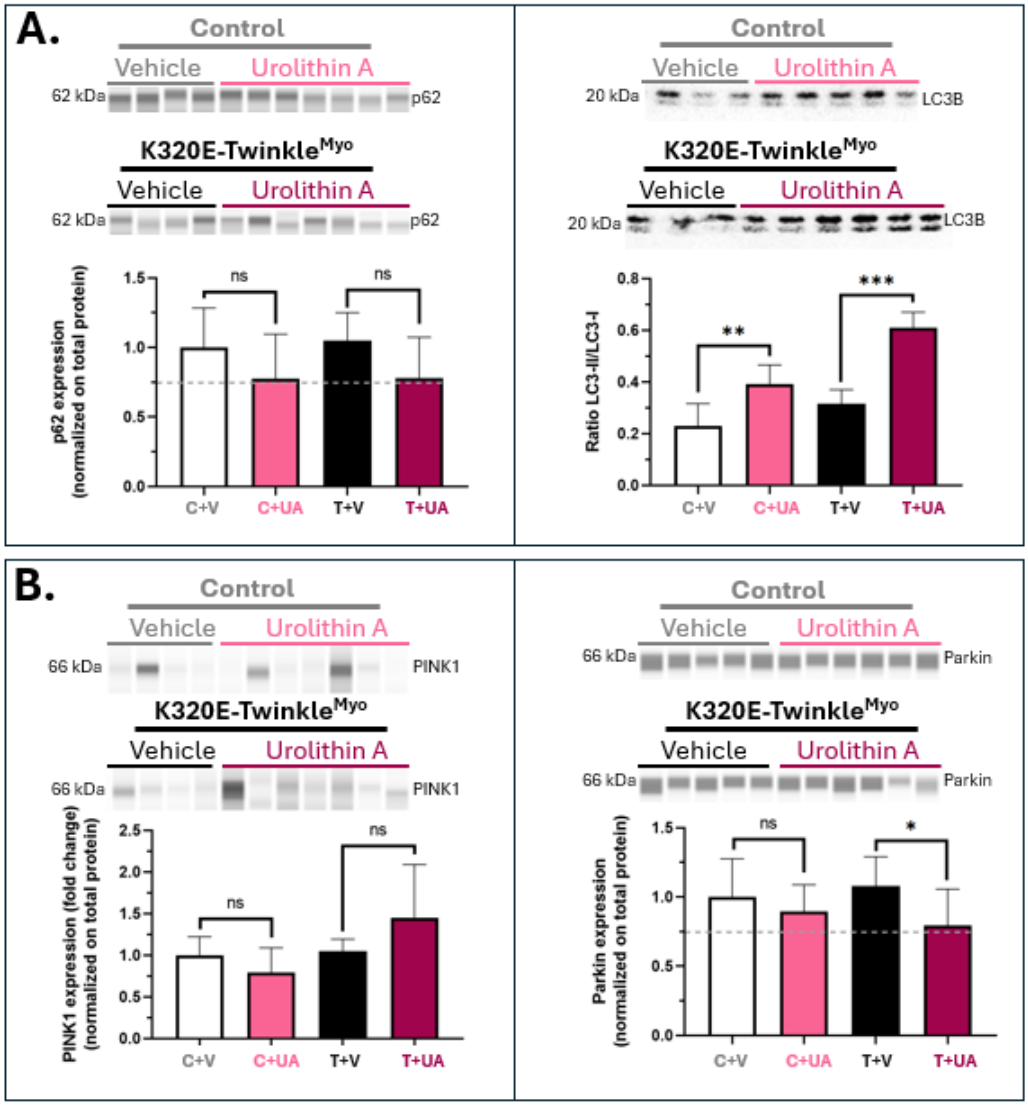


Figure 69 : Validation de l'impact du traitement à l'Urolithine A sur l'activité de mitophagie chez les souris contrôles et K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois

A) Marqueurs d'autophagie. A gauche : Signaux obtenus pour p62 via le système Jess® et quantification. A droite : Western blot de LC3B et quantification. **B)** Mitophagie Parkin-dépendante. Signaux obtenus pour PINK1 (gauche) et Parkin (droite) via le système Jess® et quantifications respectives. n = 6.

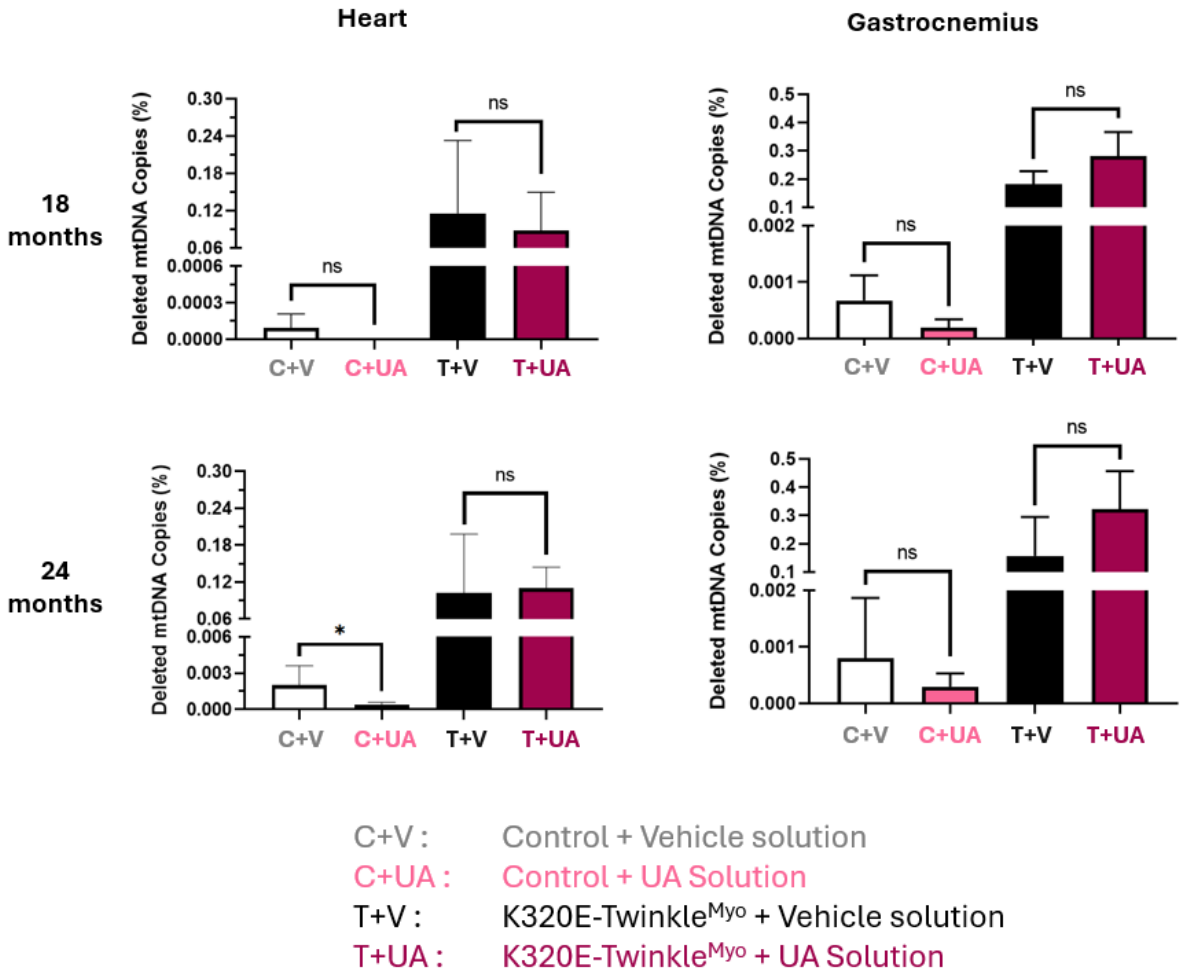


Figure 70 : Impact de l'UA sur le taux de copie d'ADNmt présentant une délétion dans le cœur et les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois

Quantifications des séquences d'ADNmt résultant des délétions A, B ou C. Les amplifications ont été effectuées sur de l'ADN total extrait de cœur et de gastrocnémien de souris contrôles et K320E-Twinkle^{Myo} de 18 et 24 mois après 56 jours d'injection IP journalière de 20 µg d'UA. n=3-6.

3.4.4. L'UA n'a pas d'effet significatif sur la COX-déficience dans le cœur et les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois et les réduits à 24 mois

Malgré l'absence d'impact de l'UA sur le taux de délétions chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}, nous avons tout de même vérifié les taux de cellules COX^{-} après traitement à 18 mois et 24 mois (**Figure 71**). Après coloration COX/SDH et comptage des cardiomyocytes bleus, aucune différence significative n'a pu être observée entre les animaux traités au véhicule et à l'urolithine A, malgré une tendance à la diminution chez les souris mutantes âgées de 18 mois.

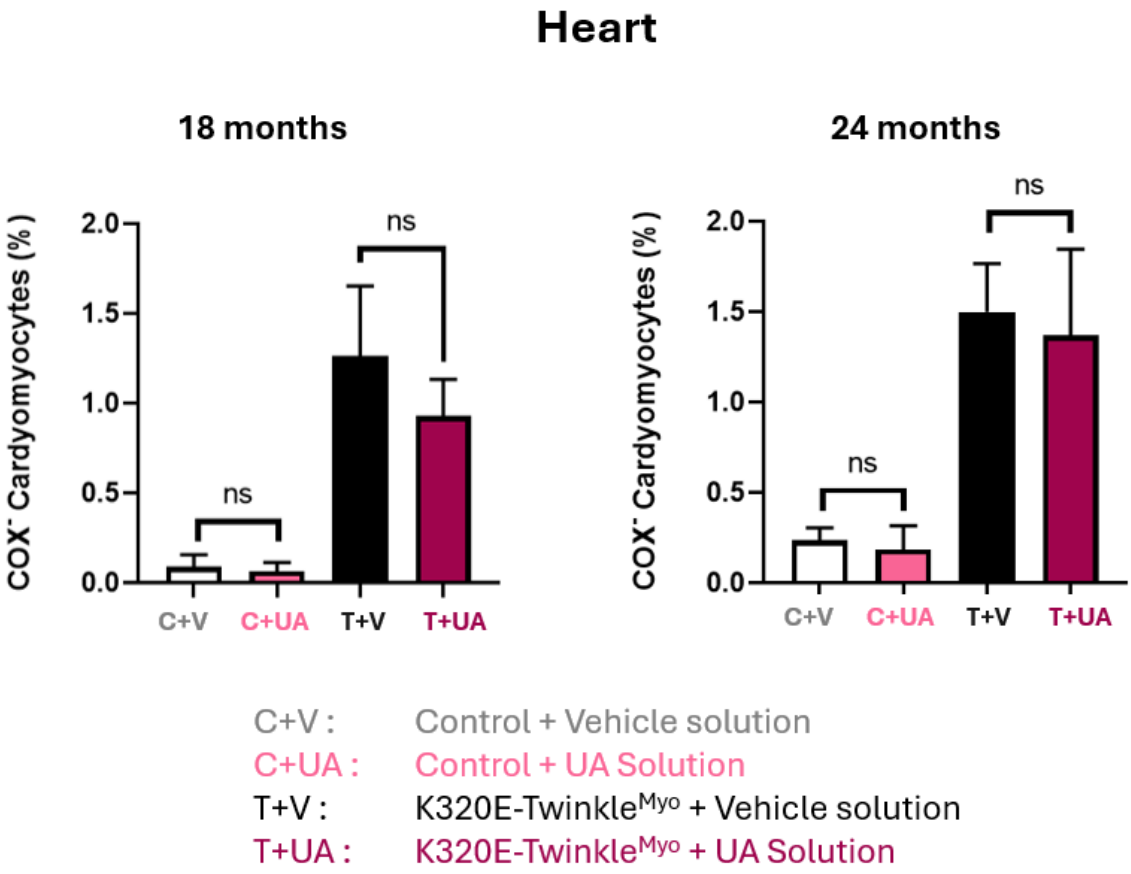


Figure 71 : L'Urolithine A n'a pas d'impact significatif sur le taux de cellules COX^{-} dans le cœur des souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois

Quantifications obtenues par comptage manuel des cellules COX^{-} sur des cryo-coupes de 10 µm de cœur de souris contrôles et K320E-Twinkle^{Myo} de 18 et 24 mois après 56 jours d'injection IP journalière de 100 µg d'UA.

4. Conclusion-discussion

4.1. Remise en contexte

Face à une population mondiale vieillissante[216], du fait de l'augmentation de l'espérance de vie, liée à l'amélioration des techniques médicales et du niveau de vie global, il est important d'étudier les pathologies pour lesquelles l'âge est un facteur de risque, afin de privilégier un vieillissement plus physiologique (healthy aging) au vieillissement pathologique (pathological aging). Les MCV sont d'un intérêt particulier car elles sont la 1ère cause de mortalité dans le monde[7] et étroitement corrélée au vieillissement puisque la prévalence d'arythmies cardiaques augmente considérablement chez les personnes âgées.[266] La perte de masse musculaire liée à l'âge ou sarcopénie[10] est aussi à mettre en lumière puisque même si elle n'est pas létale en tant que telle, elle est impliquée dans la survenue d'accidents domestiques causés par la fragilité musculaire et osseuse chez les personnes âgées, dont l'issue est souvent fatale.[223]

Il existe plusieurs théories du vieillissement mais les mitochondries, organites à l'interface de nombreuses voies métaboliques cellulaires, notamment la phosphorylation oxydative qui permet l'anabolisme de l'ATP, ou encore la β-oxydation des acides gras, sont de plus en plus décrites comme des acteurs majeurs de ce processus. Dans le cœur par exemple, les mitochondries représentent environ 30 % du volume des cardiomyocytes et elles accumulent des dommages lors du vieillissement, notamment au niveau de leur génome.[294] A l'instar du phénotype typique des maladies mitochondriales telles que l'AOD[295] la PEO[94] ou le KSS[296], ces altérations de l'ADNmt accumulées au cours du vieillissement génèrent des mosaïques de cellules déficientes en activité respiratoire[297] pouvant être mise en évidence par double coloration enzymatique COX/SDH[298].

Pour étudier le lien de causalité entre l'accumulation de délétions de l'ADNmt des CM ou de myocytes COX^-, un modèle d'étude murin a été développé, la souris K320E-$Twinkle^{Myo}$, qui exprime la mutation de Twinkle, l'hélicase mitochondriale, orthologue à la mutation K319E, identifiée chez des patients atteints du SANDO, un syndrome grave pouvant accompagner la PEO. Cette mutation K320E-TWINKLE chez la souris induit de larges délétions de l'ADNmt et un pattern de mosaïque mitochondriale dans le cœur (0.5 % de CM COX^- à 18 mois, soit autant que dans le cœur d'un humain d'environ 70 ans)[8], qui est impliqué dans la pathogenèse d'arythmies ventriculaires.

Afin de déterminer si le phénotype de ce modèle de vieillissement pathologique cardiaque pouvait être contré en ralentissant ou corrigeant l'accumulation des délétions de

l'ADNmt, nous avons opté pour une approche de modulation des CQ de cet ADNmt : la dynamique mitochondriale et la mitophagie.

4.2. La fusion mitochondriale à un rôle protecteur lors du vieillissement cardiaque et musculaire

Pour investiguer l'impact de la dynamique mitochondriale sur le vieillissement, nous avons choisi de moduler l'expression génétique de *Drp1* et *Opa1*, deux gènes codant pour des acteurs protéiques majeurs des deux pendants de cette dynamique : la fission et la fusion, respectivement. A cette fin, nous avons croisé le modèle d'accumulation de délétions de l'ADNmt K320E-Twinkle^{Myo} avec des modèles d'haplo-insuffisance de ces protéines : *Drp1*$^{+/-}$ et *Opa1*^{delTTAG}.[276,277] Nous avons pu mettre en évidence qu'une perte d'expression de 50 % de la protéine OPA1 entraine l'accumulation d'environ 2 fois plus de CM et myocytes COX^{-} chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} âgées de 18 mois, sans altérer le taux de délétion de l'ADNmt. Cette dernière observation a été confirmée par deux méthodes différentes, à savoir la qPCR pour amplifier 3 délétions fréquentes chez la souris âgée, et un séquençage global de type NGS. Cette découverte est intrigante, car chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}, nous avions montré par microdissection LASER que la COX-déficience était bien due à la présence de délétions, et non pas à une déplétion de l'ADNmt. Nous aurions donc pu nous attendre à avoir globalement plus de délétions dans les cœurs de souris K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG}, puisqu'ils présentent plus de cellules COX^{-}. Pour expliquer l'absence de différence sur ce paramètre, nous émettons l'hypothèse que la fusion mitochondriale influence le taux critique d'hétéroplasmie de l'ADNmt conduisant à la perte d'activité mitochondriale. Ainsi, dans notre modèle d'haplo-insuffisance en protéine OPA1, on peut imaginer que le taux critique d'hétéroplasmie est abaissé, passant par exemple de 60% de copies d'ADNmt portant des délétions à 50 %, ce qui expliquerait qu'à taux égal de délétions dans les homogénats de cœur des souris K320E-Twinkle^{Myo} et K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG}, on observe plus de cellules COX^{-} chez ces dernières. En effet, la fusion permet de complémenter les contenus matriciels, et l'accumulation de nombreuses délétions dans une mitochondrie isolée peut être temporisée par partage avec une mitochondrie adjacente, pour en quelque sorte maintenir la fonctionnalité de ces deux organites. Dans le cœur des souris K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG}, ce phénomène pourrait être amoindri, entrainant une présence accrue de mitochondries isolées contenant des taux délétères d'ADNmt muté, et cette mauvaise répartition des délétions pourrait potentiellement

influencer le développement de la COX-déficience. Si l'on suit la logique de cette hypothèse, il faudrait presque considérer l'hétéroplasmie au niveau mitochondrial plutôt que cellulaire, ce qu'il est possible d'analyser en utilisant une méthode combinant FACS[299] et un immunomarquage des lésions 8-OHdG de l'ADNmt[300], ou même du FISH (Fluorescent In-Situ Hybridization).[301] On peut toutefois considérer en regard de ces résultats que **la fusion mitochondriale joue un rôle protecteur contre l'accumulation de cellules déficientes en activité mitochondriale au cours du vieillissement cardiaque**. Ce rôle protecteur n'est pas étonnant en soi, le vieillissement étant souvent accompagné d'une fragmentation progressive du réseau mitochondrial.[229,302,303] En revanche, l'altération de *Drp1* n'a montré aucune conséquence phénotypique à 18 mois, ce qui pourrait s'expliquer par une diminution relativement faible de l'expression de DRP1 dans le cœur des souris, d'environ 25 %.

4.3. La stimulation de la fusion mitochondriale par le M1 fusion promoter n'a pas amélioré le phénotype cardiaque des souris K320E-Twinkle^{Myo} à la dose testée.

Malgré le fait que le traitement au M1 ait entrainé une surexpression globale de la protéine OPA1 chez les animaux traités, aucune différence significative en termes de taux de délétions de l'ADNmt ou de cardiomyocytes COX-déficients n'a pu être identifiée. Cependant, l'analyse des histogrammes montre qu'à 24 mois il y a une tendance à la diminution du taux de délétions de l'ADNmt dans le cœur et le muscle et du taux de cellules COX$^-$ dans le cœur (le muscle est en cours d'analyse pour ce paramètre). Nous avons dû nous résoudre à utiliser une dose de M1 (300 µg/jour) compatible avec sa solubilité dans la solution véhicule, et permettant de ne pas dépasser les 200 µl de volume d'injection intrapéritonéale. Cette approche de traitement journalier 7 j/7 sur 2 mois s'est révélée lourde, avec des cohortes de souris chevauchantes, qui font que cette expérience clé s'est déroulée sur une période de 5 mois (avec le traitement à l'urolithine A), ne permettant pas de multiplier les doses testées. Au vu de ces résultats, il conviendrait de renforcer les effectifs de cette cohorte de traitement au M1 afin d'avoir une vision définitive de l'impact de cette molécule sur le vieillissement cardiaque d'origine mitochondriale.

4.4. La souris K320E-TwinkleMyo présente une mitophagie exacerbée

Lorsque les délétions de l'ADNmt s'accumulent et induisent la COX-déficience, la CR, dont les sous-unités ne sont plus codées correctement, subit un découplage qui entraine une diminution du potentiel de membrane mitochondrial. De ce fait, de nombreux acteurs sont localement recrutés pour initier l'autophagie sélective de ces mitochondries déficientes, la mitophagie.[166] Chez l'Homme, le potentiel de mitophagie décline avec l'âge.[304] Ainsi, nous avons investigué l'état de mitophagie basal chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} qui subissent ce phénomène d'accumulation de cellules COX^{-} avant de l'analyser après stimulation pharmacologique à l'urolithine A.

Nous avons identifié en WB une diminution de l'expression de p62 chez les animaux K320E-Twinkle^{Myo}, indiquant très probablement une dégradation liée à une autophagie exacerbée. C'est ce que nous avons pu confirmer par immuno-marquage de LC3 et LAMP2 sur CM isolés. Des agrégats massifs de LC3 sont observés, entourés de nombreux lysosomes qui témoignent d'une autophagie augmentée. Cette diminution de p62 avait aussi été observée dans des cellules satellite exprimant le variant K320E-Twinkle[305], renforçant notre résultat obtenu dans le cœur. Cependant, le ratio LC3B-II/I nous suggérait l'inverse, c'est-à-dire moins de forme lipidée (LC3B-II) donc à priori moins d'autophagie. L'ambiguïté de ces deux résultats peut également et simplement s'expliquer par une activité d'autophagie tellement forte que LC3B-II est, au même titre que p62, intensément dégradée. L'exploration de l'expression de PINK1 et Parkin semble indiquer qu'il s'agit plutôt d'une mitophagie par une voie Parkin-indépendante.

4.5. La stimulation de la mitophagie par l'UA n'est pas suffisante pour améliorer le phénotype cardiaque des souris K320E-Twinkle^{Myo} à la dose testée

Le traitement à l'UA a montré un impact significatif sur l'autophagie, le ratio LC3B-II/I obtenu par WB étant augmenté chez les souris l'ayant reçu, quel que soit leur génotype. En revanche, p62 ne montre pas de différence d'expression après traitement. De plus, l'expression de PINK1 et Parkin est globalement peu perturbée, sauf chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} à 24 mois pour lesquelles l'expression de Parkin est significativement diminuée.

L'urolithine A n'a pas montré d'effet significatif sur le taux de délétions de l'ADNmt dans le cœur des animaux testés, à l'exception des souris contrôles à 24 mois. Un examen plus approfondi des histogrammes obtenus semble indiquer que chez ces animaux contrôles, il y a systématiquement une tendance à la diminution du taux de délétions après traitement, quel que soit l'âge, dans le cœur et le muscle. Les effectifs d'animaux sont potentiellement trop faibles pour voir un effet significatif, mais l'absence d'effet sur les souris K320E-Twinkle^{Myo} pourrait signifier qu'à la dose testée (20 µg/jour) l'urolithine A est efficace uniquement lorsque le taux de délétions est faible dans les cardiomyocytes, ce qui n'est pas le cas chez les souris mutantes.

En ce qui concerne le taux de CM COX^{-}, aucune différence significative a été observée post-traitement, avec tout de même une tendance à la diminution à 18 mois chez les animaux contrôles et mutants. Pour cette molécule, nous avons aussi été confrontés à des difficultés de solubilisation dans les solutions véhicules testées, et avons dû nous résoudre à utiliser la dose journalière la plus faible que nous ayons notée dans la littérature sur les études *in vivo* qui l'ont utilisée. Ainsi, nous ne pouvons pas exclure que l'urolithine A aurait un impact plus prononcé sur le taux de délétions de l'ADNmt et de cardiomyocytes COX^{-} à une dose journalière plus élevée.

5. Perspectives

5.1. Limitations de l'étude

La limitation principale de cette étude est le manque d'effectif murin nécessaire, dû aux contraintes liées au vieillissement avancé des souris (18 et 24 mois), ainsi qu'aux nombreux génotypes impliqués (Contrôle, K320E-Twinkle^{Myo}, *Drp1*$^{+/-}$, *Opa1*^{delTTAG}, K320E-Twinkle^{Myo}-*Drp1*$^{+/-}$ *et* K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG}*).* Les résultats obtenus seront ainsi à renforcer par la suite afin de définir de manière significative l'impact de la modulation de la fusion mitochondriale et de la mitophagie en termes de diminution du taux de copies d''ADNmt présentant des délétions, du taux de cellules COX^{-} ainsi que de la survenue de troubles du rythme cardiaque découlant de ces deux facteurs.

Une autre limitation est que nous n'avons testé qu'une dose de chaque molécule, basée sur des observations dans la littérature, mais il faudrait envisager d'en tester d'autres pour vraiment évaluer leur impact sur le phénotype cardiaque des souris K320E-Twinkle^{Myo}. La difficulté est une fois de plus liée à l'âge des souris, à la lourdeur du protocole expérimental, et bien entendu au coût conséquent d'une telle approche expérimentale. Il faudrait potentiellement faire un compromis sur le mode

d'administration des molécules en les incluant dans la nourriture des animaux. Cela ne permettrait pas de savoir précisément combien de molécule a été administrée par souris par jour (car il faudrait isoler les souris et peser la nourriture régulièrement pour évaluer la quantité ingérée), mais rendrait possible le test de plusieurs doses simultanément, avec des pellets contenant des concentrations différentes d'urolithine A et de M1 fusion promoter.

5.2. Modèle K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG}

Le résultat obtenu le plus intriguant est celui du NGS de l'ADNmt des souris issues de la cohorte OPA1. Le logiciel eKLIPse™ développé par le Dr. Goudenège au sein de notre équipe[289] indique bien la présence de duplications de l'ADNmt et de délétions chez les souris mutantes et doubles mutantes, corroborant ce qui avait été observé avec le logiciel Mitosalt[306] sur les souris K320E-Twinkle^{skm}. Mais le taux de molécules altérées de l'ADNmt est le même entre les souris K320E-Twinkle^{Myo} et K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG} à 18 mois.

Afin de comprendre comment ces souris K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG} développent plus de cellules COX^{-}, sans accumuler plus de délétions, nous souhaitons vérifier notre hypothèse d'un abaissement du seuil critique d'hétéroplasmie en cas d'haplo-insuffisance en protéine OPA1. Si cette théorie est vraie, l'analyse de l'ADNmt dans des cardiomyocytes COX^{-} de ces souris devrait révéler une proportion plus faible de copies altérées que chez ceux des souris K320E-Twinkle^{Myo} (qui avait été évaluée à 85 % dans notre étude de 2015). Pour ce faire, nous avons entrepris la collecte de pools de cellules COX^{-} isolées après marquage COX/SDH par microdissection LASER chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} et K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG}. L'ADN sera extrait dans les semaines qui viennent afin de réaliser un séquençage NGS qui permettra de définir précisément le taux d'hétéroplasmie. Nous espérons que le DAB présent dans les coupes colorées lors du marquage COX/SDH ne perturbera pas l'étape d'amplification par PCR comme cela l'a été suggéré.[307] Alternativement, les coupes pourraient subir une coloration PMS-NBT (Phenazine MethoSulphate - NitroTetrazolium Blue chloride), ce qui nous permettrait d'éviter cet écueil.[308]

5.3. Traitement au M1

Pour l'écriture de ce manuscrit de thèse, l'emphase a été mise sur le cœur mais les muscles des souris traitées au M1 et à l'UA ont également été prélevés et séparés en

plusieurs échantillons destinés à des analyses de biologie moléculaire, en plus du screening de délétions sur le gastrocnémien déjà effectué. De plus, des cryo-sections ont d'ores et déjà été réalisées pour effectuer de nouvelles colorations COX-SDH afin d'investiguer l'impact des traitements sur le taux de myocytes COX-déficients.

De nouvelles cohortes de souris destinées au traitement sont également prévues, pour renforcer les résultats existants mais également afin de voir si le M1 peut restaurer, ne serait-ce que partiellement, le phénotype K320E-Twinkle^{Myo} chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG}. En effet, comme nous avons observé une augmentation de l'expression d'OPA1 après traitement des souris K320E-Twinkle^{Myo} au M1, on peut imaginer que le traitement des souris K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG} permettrait de rétablir un niveau normal d'OPA1 et revenir à un taux de cellules COX^{-} similaire à celui du modèle K320E-Twinkle^{Myo}. Cela permettrait d'affirmer que c'est bien la quantité diminuée d'OPA1 qui entraîne le doublement du taux de cellules COX^{-} chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG}.

D'autres paramètres sont encore à analyser, notamment l'impact du traitement sur la quantité de copies d'ADNmt, et la morphologie mitochondriale post-traitement sur des coupes destinées à la microscopie électronique à transmission.

Enfin, l'analyse des ECGs permettra de déterminer si le traitement a eu un quelconque impact bénéfique sur la survenue d'arythmies cardiaques. Si tel est le cas, en l'absence d'effets significatifs sur le taux de délétions de l'ADNmt et de CM COX^{-}, il faudra envisager d'autres hypothèses.

5.4. Mitophagie chez les souris K320E-Twinkle^{Myo}

Notre évaluation de la mitophagie chez les animaux K320E-Twinkle^{Myo} avant et après traitement est révélatrice de la complexité de l'évaluation du flux autophagique avec méthodes uniquement basées sur l'évaluation de l'expression protéique telles que le WB, qui dans notre cas n'est pas exhaustive, vu qu'il reste beaucoup d'acteurs des voies mitophagiques Parkin-indépendantes à tester.

Une évaluation plus précise du flux autophagique chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} sera réalisée après blocage de la mitophagie par une injection IV de chloroquine avant le sacrifice des souris. De plus, il existe beaucoup d'outils modernes telles que les sondes mitophagiques comme mito-Keima[234], mito-QC[205], voire le modèle émergeant de mito-SRAI qui permettrait d'étudier plus finement ce qui se passe dans les cardiomyocytes des

souris mutantes. La raison pour laquelle ces approches n'ont, pour l'instant, pas été initiées est que nos souris K320E-Twinkle^{Myo} exprime l'eGFP, et qu'il nous faut d'abord acquérir des souris FLP pour retirer la cassette IRES-eGFP flanquée de séquences FRT, puis croiser ces animaux avec ceux exprimant une de ces sondes mitophagiques, ce qui demanderait un temps conséquent et qui n'était pas envisageable au cours de mon doctorat.

5.5. Traitement UA

L'efficacité du traitement à l'UA est validée par le WB de LC3B qui montre une augmentation du ratio LC3B-II/I. Cependant nous n'avons pas encore validé à 100 % qu'il s'agissait de mitophagie. C'est pourquoi nous allons effectuer en supplément une évaluation de l'expression de marqueurs des voies Parkin-indépendantes, tel que BNIP-3, et une co-immunofluorescence de LC3B, LAMP2 et VDAC1, comme réalisée précédemment chez les animaux K320E-Twinkle^{Myo}. Les agrégats que nous avions observés pourrait signifier que les lysosomes sont submergés et n'élimine pas efficacement les fragments de mitochondries défectueuses. Si cette théorie de blocage du flux autophagique est vraie, alors un traitement combinant de l'UA, qui augmente la capacité à former des autophagosomes, et une molécule stimulant l'activité lysosomale[309]pourrait s'avérer bénéfique.

Ensuite, comme pour la molécule M1, une série d'analyses restent à faire, au niveau de l'impact du traitement sur le nombre de copies d'ADNmt, le taux de cellules COX^{-}, qui n'ont pas encore été comptées dans les muscles, et l'impact sur la survenue des arythmies cardiaques.

5.6. Sénescence

La COX-déficience n'est pas la seule perte de fonction cellulaire liée au vieillissement pouvant être en lien avec une dysfonction mitochondriale, comme nous l'avons évoqué dans le manuscrit de revue. En effet, lors du vieillissement, se développe dans plusieurs cellules un phénotype de sénescence, ce blocage en phase G0 du cycle cellulaire pouvant induire un phénotype bénéfique, en protégeant de la carcinogénèse ou intervenant durant les processus de cicatrisation ou, au contraire, participant à l'inflammaging. Cette ambivalence est due aux sécrétions variées de molécules par ces cellules, essentiellement des cytokines. Ce phénotype sécrétoire est nommé SASP (Senescence Associated Secretory Phenotype). Il est capable de convertir les cellules environnantes à

la sénescence les faisant passer à un métabolisme glycolytique, comme celui qu'utilisent les cellules COX^-.[310] Ainsi se pose la question du lien entre cellule COX^- et sénescentes. Nous avons commencé à optimiser des marquages SA-βgal (qui mettent en évidence les cellules sénescentes en bleu) sur les mêmes coupes de cœur de K320E-$Twinkle^{Myo}$ à 18 mois qui sont destinées à subir les marquages COX/SDH afin d'évaluer la co-localisation éventuelle de ces types cellulaires, ou un lien entre cellules COX^- et cellules sénescentes à proximité. De plus, en collaboration avec le Dr. Jeanne Mialet-Perez, nous avons pu mettre en évidence par RT-qPCR une surexpression transcriptionnelle de cytokines impliquées dans le SASP (données préliminaires non montrées). Ces investigations vont se poursuivre dans les semaines à venir.

6.Projet annexe : Y506C, nouveau variant de *TWNK* impliqué dans l'Atrophie Optique Dominante (AOD) ?

6.1 Introduction

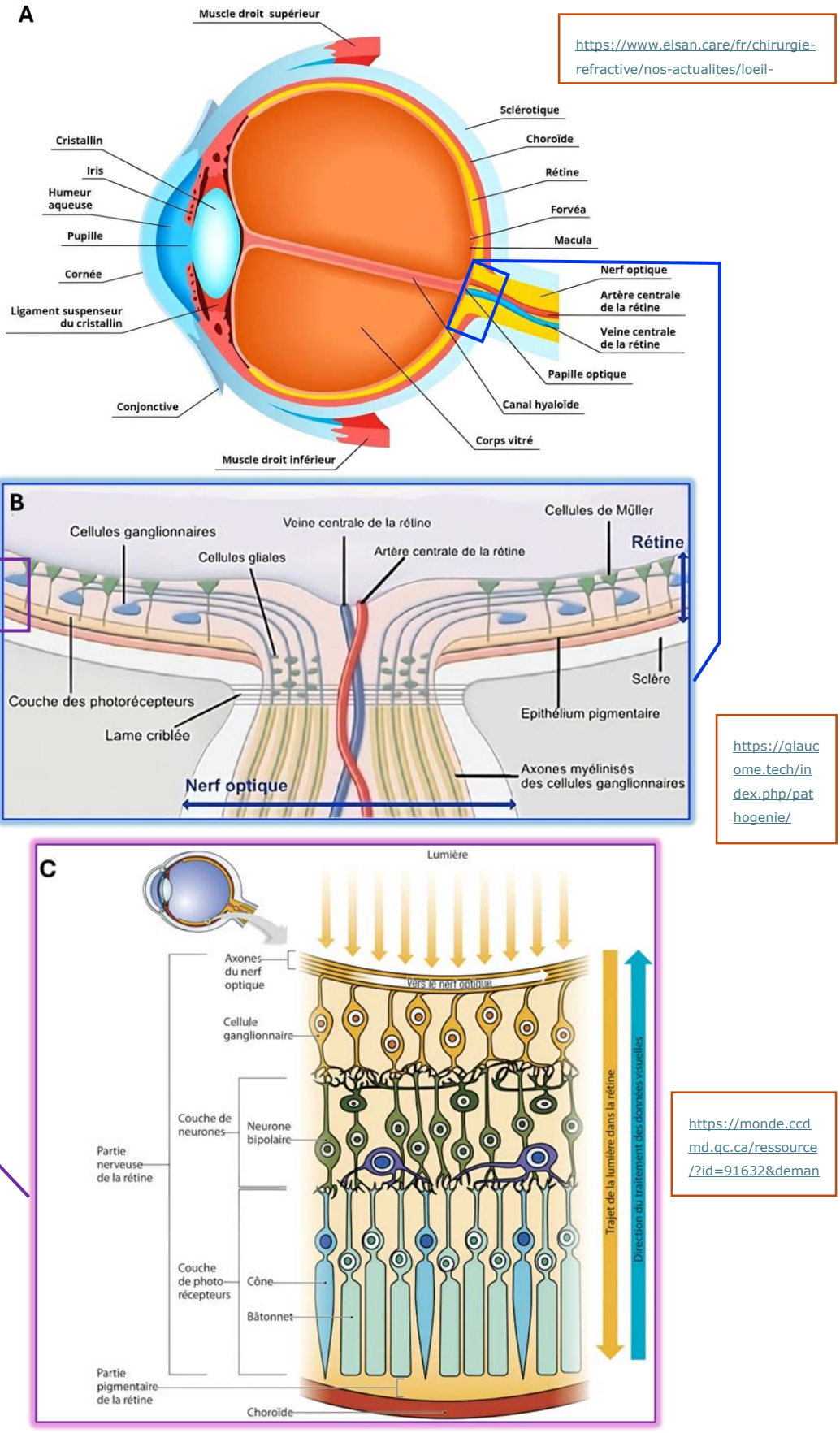
6.1.1. L'œil

L'œil humain est un organe complexe chargé de capter les informations visuelles et de les convertir en signaux neuronaux. Structurellement, il est constitué de plusieurs couches. La couche la plus externe est la sclère, un tissu fibreux protecteur qui maintient la forme de l'œil. À l'avant de l'œil, la sclère se transforme en cornée, une couche transparente qui réfracte la lumière vers la rétine. Derrière la cornée se trouve l'iris, un muscle pigmenté qui contrôle la taille de la pupille pour réguler la quantité de lumière entrant dans l'œil. Le cristallin est situé derrière la pupille et se contracte pour focaliser la lumière sur la rétine. Le grand corps vitré remplit la majeure partie du volume de l'œil, fournissant un soutien structurel et aidant à maintenir la pression intraoculaire. Les muscles oculaires, tels que les droits supérieurs et inférieurs, contrôlent le mouvement des yeux. Ensemble, ces structures (**Figure 72 A**) facilitent la capture et la focalisation précises de la lumière, ce qui est essentiel pour former des images claires sur la rétine.[311]

Le nerf optique est le principal conduit de transmission des informations visuelles de la rétine au cerveau. Ce nerf comprend des axones provenant de cellules ganglionnaires

rétiniennes (CGR), qui se regroupent au niveau du disque optique, également appelé tache aveugle en raison de l'absence de cellules photoréceptrices. Le nerf traverse une zone perforée de la sclère appelée lamina cribrosa, un site sujet aux dommages dans des conditions pathologiques telles que le glaucome.[312] L'apport sanguin au nerf optique est essentiel et est assuré par des branches de l'artère et de la veine centrale de la rétine, garantissant un apport suffisant d'oxygène et de nutriments aux axones. Les cellules gliales, comme les cellules de Müller, sont également présentes et soutiennent la fonction nerveuse en maintenant l'environnement extracellulaire et en assurant la stabilité structurelle.[311] Ces caractéristiques soulignent l'importance du nerf optique en tant que structure délicate et complexe (**Figure 72 B**) essentielle à la vision, où toute perturbation peut entraîner une déficience visuelle.

La rétine est une structure stratifiée située à l'arrière de l'œil, spécialisée dans la détection de la lumière et le traitement des informations visuelles avant qu'elles n'atteignent le cerveau. Elle se compose de plusieurs couches de cellules, chacune jouant un rôle distinct dans la vision. La couche la plus externe, l'épithélium pigmentaire rétinien, absorbe l'excès de lumière et fournit des nutriments aux photorécepteurs, qui comprennent les bâtonnets et les cônes. Les bâtonnets sont très sensibles à la lumière et essentiels à la vision nocturne, tandis que les cônes sont responsables de la vision des couleurs et de l'acuité visuelle.[313] Les signaux lumineux reçus par les photorécepteurs sont transmis aux cellules bipolaires puis aux cellules ganglionnaires, qui forment le nerf optique. Les cellules horizontales et amacrines de la rétine assurent la connectivité latérale, permettant un traitement visuel complexe et une amélioration du contraste. Cette organisation en couches garantit que les informations visuelles sont traitées efficacement et transmises au cerveau de manière précise. La rétine est notamment hautement vascularisée, afin d'alimenter chaque couche, en particulier les photorécepteurs, exigeants sur le plan métabolique.[314] Cette structure complexe (**Figure 72 C**) démontre le rôle crucial de la rétine en tant qu'interface sensorielle de l'œil avec le cerveau.



https://www.elsan.care/fr/chirurgie-refractive/nos-actualites/loeil-

https://glaucome.tech/index.php/pathogenie/

https://monde.ccdmd.qc.ca/ressource/?id=91632&deman

Figure 72 : Anatomie de l'œil et de la rétine.

A) Structure globale de l'œil. **B)** Zoom sur la zone de passage de la rétine au nerf optique. **C)** Couches et types cellulaires composant la rétine.

6.1.2. L'AOD

6.1.2.1. Référencement

L'Atrophie Optique Dominante (AOD, OMIM #165500), initialement appelée atrophie optique de Kjer, a été décrite pour la première fois par l'ophtalmologue Danois Dr Poul Kjer.[295] L'AOD est également appelée atrophie optique dominante autosomique (ADOA), pour souligner son mode de transmission, contrairement aux atrophies optiques récessives (syndrome de Behr, syndrome de Wolfram) et à la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON), héritée par des mutations sur le génome mitochondrial à transmission maternelle.[58]

AODplus : L'atrophie optique dominante plus (OMIM #125250) est un terme regroupant des formes syndromiques de l'AOD, y associant généralement une surdité et/ou d'autres manifestations cliniques comme la myopathie, l'ophtalmoplégie externe progressive (PEO), la neuropathie périphérique, l'accident vasculaire cérébral, la sclérose en plaques ou la paraplégie spastique.

6.1.2.2. Définition

L'AOD est une neuropathie optique due à la dégénérescence des fibres du nerf optique. Elle appartient au groupe des neuropathies optiques héréditaires (NOH), qui sont des maladies génétiques affectant les cellules ganglionnaires de la rétine (RGC) dont les axones forment le nerf optique. L'AOD fait partie des maladies mitochondriales, car les gènes qui en sont responsables codent souvent pour des protéines de cet organite, exprimées de manière ubiquitaire.[315] L'AOD peut être syndromique et inclure des affections extra-oculaires, principalement neuro-musculaires, fréquemment associées aux maladies mitochondriales.[316] Les gènes les plus fréquemment touchés sont *OPA1*[123], *ACO2*[317] et *WFS1*[318], mais une dizaine d'autres sont très bien décrits[57], et il en existe probablement plus.

6.1.2.3. Épidémiologie

L'AOD est une forme relativement courante de neuropathie optique héréditaire (80 % des cas) dont la prévalence mondiale est de 1:30000, mais elle peut atteindre 1:10000 au Danemark où un effet fondateur a été identifié.[319,320] La pénétrance de l'AOD est d'environ 70 %, mais selon les familles, les mutations et les critères d'étude, elle peut varier de 100 % à 43 %. L'AOD syndromique et l'AODplus représentent environ 20 % de tous les cas d'AOD et sont entièrement pénétrantes.[58]

6.1.2.4. Description clinique

La maladie a été décrite pour la première fois à la fin du 19e siècle.[321,322] Dans la plupart des cas, l'AOD se présente comme une neuropathie optique bilatérale non syndromique et bien qu'elle soit généralement diagnostiquée chez des enfants d'âge scolaire se plaignant de problèmes de lecture, la maladie peut se manifester plus tard, à l'âge adulte.[323–325]

Les patients présentent généralement une diminution lente, progressive, irréversible et très variable de la vision (acuité visuelle : 6/10 à 2/10).[326]

Lors de l'examen du fond d'œil, le disque optique présente généralement une pâleur bilatérale et symétrique de son côté temporal, témoignant de la perte des CGR. Le bord du nerf optique est atrophié et l'épaisseur de la couche de fibres nerveuses rétiniennes péripapillaires est réduite. Le champ visuel montre généralement un scotome caecocentral (entre la tache aveugle et le centre du fond de l'œil), et moins fréquemment un scotome central ou paracentral (plus haut).[327]

Il existe une une dyschromatopsie, (une confusion des couleurs) de l'axe bleu-jaune spécifique à l'AOD, qui, lorsqu'elle est détectée, est fortement révélatrice de la pathologie.[328]

Ensemble, ces symptômes (**Figure 73**) deviennent très handicapants pour les patients au fil de l'évolution de l'AOD. Malheureusement, il existe des variantes syndromiques accompagnée de symptômes bien plus sévères, la DOAD (atrophie optique associée à une surdité) et l'AODplus.

Les DOAD et AODplus représentent jusqu'à 20 % des patients atteints d'AOD avec une mutation OPA1.[319] Le signe extra-oculaire le plus fréquent est la perte auditive, mais une myopathie et une neuropathie périphérique peuvent survenir plus tard au cours de la vie, suggérant qu'il existe un continuum de présentations cliniques allant d'une AOD classique affectant uniquement le nerf optique, à une présentation sévère et systémique. Une PEO est également fréquemment diagnostiquée chez les patients AODplus syndromiques.[319] De plus, la biopsie musculaire d'un patient AODplus a révélé des caractéristiques typiques des myopathies mitochondriales, car environ 5 % des myocytes étaient COX^- et plusieurs RRF étaient observables.[329] Cela est corrélé avec le fait que l'acteur génétique majoritairement impliqué dans les AOD, *OPA1*, est un facteur nécessaire à la fusion mitochondriale en initiant celle des IMM[59], suggérant un rôle majeur de la déficience mitochondriale dans le développement de cette pathologie.

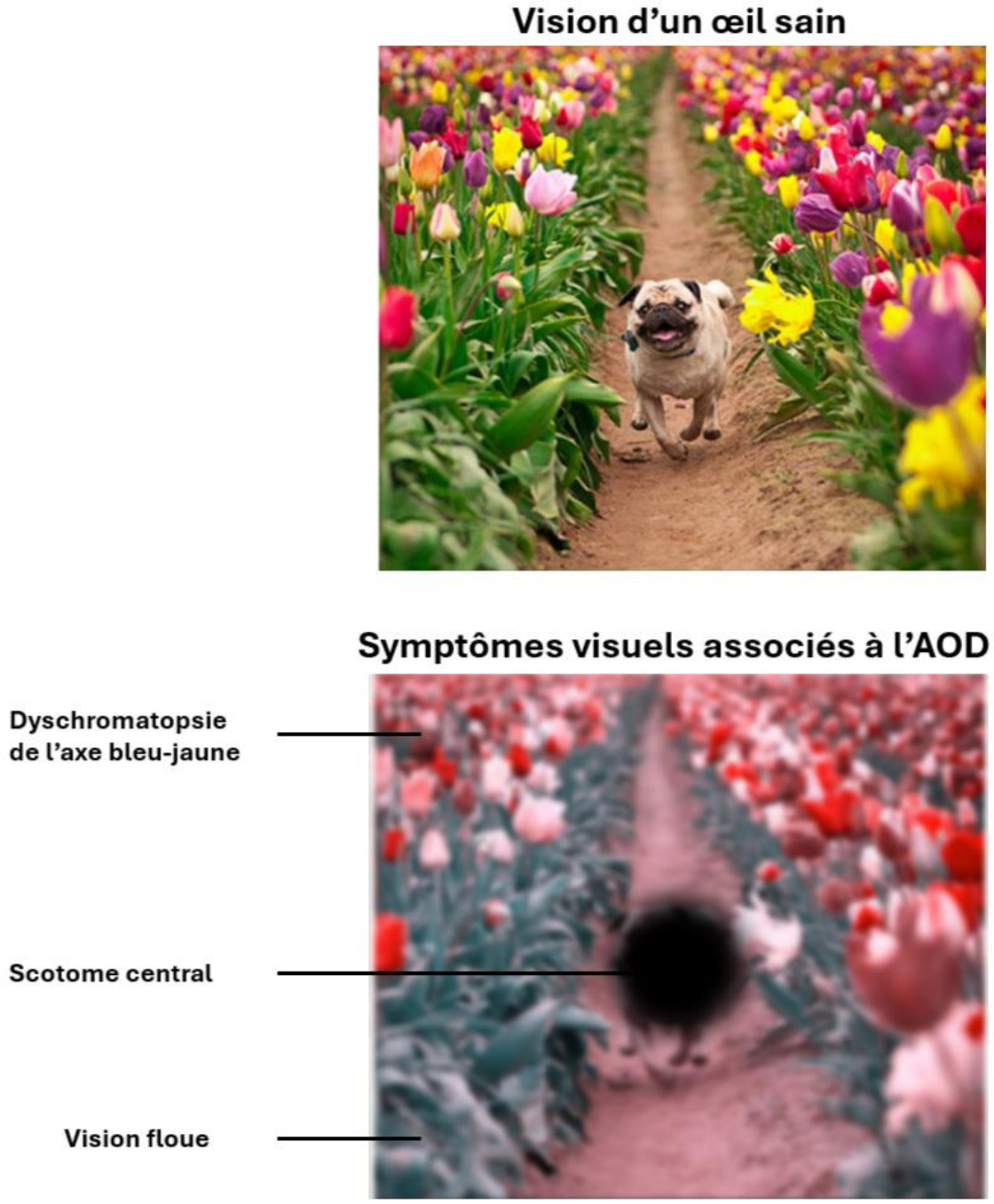


Figure 73 : Symptômes principaux de l'Atrophie Optique Dominante

Ces symptômes peuvent apparaitre ou non, de manière précoce ou non mais généralement dans cet ordre : diminution progressive de l'acuité visuelle, dyschromatopsie généralement de l'axe bleu-jaune, apparition d'un scotome central (ou caeco-central ou paracentral) qui s'étend avec l'âge. Image obtenue sur *https://www.ipnoze.com/gens-daltonisme-voient-monde/* et modifiée.

6.1.3. Contexte de l'étude annexe

Lorsqu'une AOD est diagnostiquée, il est d'usage de séquencer en première intention un panel de gènes typiquement impliqués dans cette pathologie, tels que *OPA1*, *ACO2* ou *WFS1* par exemple.[57] Si les résultats sont négatifs, alors des exomes complets du patient et de ses parents les plus proches sont réalisés par les cliniciens afin d'identifier des gènes porteurs de mutations dominantes ou récessives, potentiellement pathogènes, dont le patient aurait hérité, ou bien sporadiques. En effet, l'AOD étant une maladie à pénétrance incomplète, une mutation sur un seul allèle pourrait être impliquée, même si les parents du patient ne sont pas atteints.

C'est dans ce contexte que nous avons identifié, au CHU d'Angers, 3 variants de Twinkle, l'hélicase mitochondriale, chez des patients souffrant d'AOD. Ces variants sont I238V, K184R et Y506C. Pour les variants I238V et K184R, le changement d'acide aminé n'induit pas de changement de charge, suggérant un impact modéré. En revanche, le variant Y506C entraine le changement d'une tyrosine, AA dont la chaine dispose d'un groupe aromatique phénol, en une cytosine, AA à chaine courte disposant d'un groupe thiol, capable de créer des ponts disulfures avec d'autres groupes thiol de la protéine, pouvant ainsi altérer sa structure secondaire. Le variant Y506C est d'ailleurs prédit comme pathogène par plusieurs outils tel que PolyPhen-2, alors que les deux autres sont prédits comme bénins (**Figure 74**).

Afin de déterminer l'impact de ces variants sur l'ADNmt et le réseau mitochondrial, nous avons développé des approches de transfections sur un modèle cellulaire du laboratoire, les cellules UACC-62. Nous avons également pu obtenir des fibroblastes primaires d'un patient et de son père pour le variant Y506C, afin d'étudier la morphologie mitochondriale et la capacité à répliquer l'ADNmt après une déplétion induite chimiquement.

Les données cliniques montrent que le patient se cognait souvent à l'âge de 3 ans. Son acuité visuelle est passée à 6/10 à chaque œil, de manière stable, après prescription de lunettes d'hypermétropie. A l'âge de 9 ans, une pâleur du nerf optique a été constatée. Une IRM a été effectuée, centrée sur les voies optiques, mais elle n'a révélé rien d'anormal. Il n'y avait en outre pas de troubles du champ visuel périphériques ni de dyschromatopsie. L'enfant avait des difficultés à voir les détails de loin et était placé au premier rang en classe. Il était capable de lire des petits caractères de près, mais avec plus de fatigabilité. A ce moment, le diagnostic d'atrophie optique a été posé. A 14 ans, il a développé une dyschromatopsie sans axe défini, la tâche aveugle s'est légèrement étendue et la couche de fibres optiques de sa rétine est devenue légèrement plus fine. La progression de sa pathologie est, comme pour beaucoup de cas d'atrophie optique, lente

(**Figure 75 A**). Son père présente le même variant (**Figure 75 B**), sans afficher aucun symptôme de la pathologie, ce qui suggère une pénétrance incomplète, si cette mutation Y506C de Twinkle est bien impliquée dans la pathologie de manière dominante.

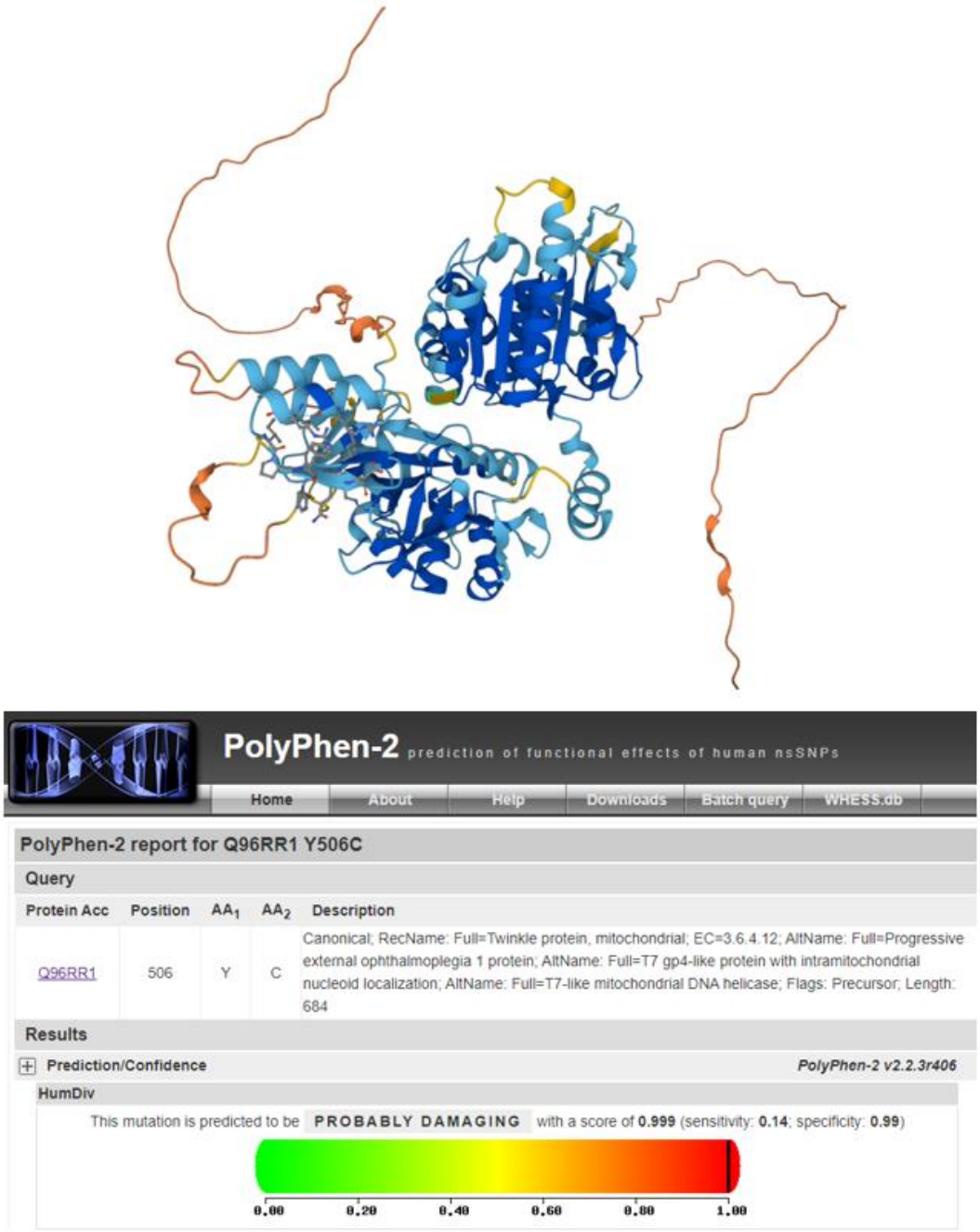


Figure 74 : Structure et prédiction de pathogénicité du variant Y506C de Twinkle

La structure prédictive a été obtenue grâce au logiciel en ligne Alphafold. La prédiction a été effectuée sur le logiciel en ligne Polyphen-2. Le résidu ayant subi la mutation est orange, en surbrillance verte, au centre de la protéine.

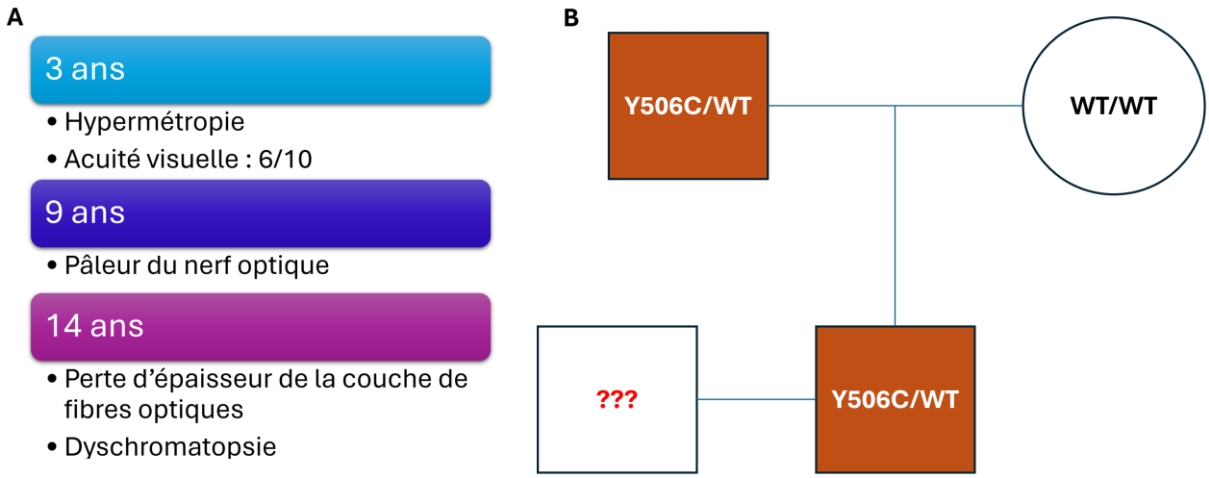


Figure 75 : Informations sur le patient Y506C

A) Suivi médical du patient portant le variant Y506C de TWINKLE. **B)** Pédigrée génétique de la famille. Le patient et son père sont tous les deux porteurs du variant Y506C de Twinkle sur un allèle, la mère non et l'ADN du frère n'a pas subi de séquençage. La mère et le frère ne présente aucun symptôme d'AOD ni de troubles de la vision.

6.1.4. Objectif de l'étude annexe

6.1.4.1. Impact de la transfection de plasmides d'expression des 3 variants sur le réseau et l'ADN mitochondriaux de la lignée UACC-62

Dans un 1er temps, un modèle cellulaire simple a été développé. L'objectif était de transfecter un vecteur d'expression forte de Twinkle et ses 3 variants identifiés par nos cliniciens dans une lignée cellulaire afin de déterminer l'impact sur le réseau et l'activité respiratoire mitochondriale ainsi que la stabilité et la structuration de l'ADNmt. Ainsi, les cellules de mélanome UACC-62 ont été choisies, et ont été transfectées avec un plasmide pTwinkle-IRES2-eGFP. En cas d'impact négatif d'une mutation, nos attentes étaient une déstructuration des nucléoïdes avec délétions/déplétion de l'ADNmt, et potentiellement une fragmentation du réseau mitochondrial.

6.1.4.2. Impact du variant Y506C sur le réseau et l'ADN mitochondriaux du patient et de son père

Dans un deuxième temps, nous avons travaillé sur des échantillons biologiques du patient porteur du variant Y506C de Twinkle et de son père, des analyses de l'intégrité de l'ADNmt et de la capacité respiratoire ont été effectuées par nos cliniciens afin de savoir si le variant était suffisant pour induire une affection mitochondriale chez le père malgré une absence de symptômes. Dans la même optique a ensuite été effectuée une série de marquages live du réseau mitochondriale et de l'ADNmt dans l'espoir de voir une modification permettant étayer la théorie de la pénétrance incomplète de cette potentielle mutation qui serait alors la 1ère mutation de Twinkle responsable d'une AOD. Afin d'éliminer Une grande limitation du modèle fibroblaste est le très faible recyclage mitochondrial du fait d'une très faible utilisation des mitochondries, donc d'une faible activité réplicative dépendante de Twinkle et de ses mutations. Ainsi la réplication de l'ADNmt par Y506C-Twinkle a été exacerbée grâce à une déplétion de l'ADNmt induite par traitement au BET (Bromure d'Ethidium). Nous avons ensuite quantifié l'ADNmt des fibroblastes de manière régulière après le traitement, nous attendant à une capacité de réplication plus faible chez le père du patient.

6.2. Matériel et Méthode

6.2.1. L'identification de variants potentiellement pathogènes de *TWNK*.

Trois nouvelles mutations du gène codant pour la protéine Twinkle ont été identifiées dans les séquençages exomes de patients souffrant d'AOD. Ces mutations entrainent des changements d'acides aminés dans la protéine : K184R, I238V et Y506C. Ces exomes ont été réalisés en deuxième intention par les cliniciens de notre laboratoire. En effet, un premier séquençage d'une cohorte de gènes habituellement impliqués dans les AOD avait d'abord été réalisé (*OPA1*, *ACO2*, *WFS-1*, etc…)[57], mais il n'a révélé aucune anomalie. Nous avons souhaité déterminer l'impact de ces variants protéiques sur la répartition de l'ADN mitochondrial et sur le réseau mitochondrial dans un modèle de lignée cellulaire du laboratoire en attendant d'obtenir et d'étudier les fibroblastes du patient avec la mutation Y506C, celle qui nous apparaissait comme la plus prometteuse car prédite comme très probablement pathogène par le logiciel Polyphen-2 (**Figure 74**). La mutation K319E de Twinkle, connue pour ses conséquences sur la stabilité de l'ADNmt dans le cadre du SANDO[85], mutation orthologue à K320E utilisée dans notre modèle d'accumulation

accélérée de délétions de l'ADNmt[8], a servi de contrôle positif lors des manipulation présentées par la suite.

6.2.2. Transfection transitoire de variants de *TWNK* dans des cellules UACC-62

6.2.2.1. Mutagenèse dirigée de *TWNK*

Les plasmides contenant les séquences des variants de *TWNK* identifiés chez les patients souffrant d'AOD ont été obtenus par mutagénèse dirigée à partir de la séquence codante originale *TWNK* contenue dans le plasmide commercial NM_021830 « Human Tagged ORF Clone » de chez Origene (**Figure 76**).

La mutagénèse a été réalisée grâce à la méthode In-Fusion (Takara) en utilisant des amorces contenant les mutations K184R, K319E, I238V et Y506C désirées (

Tableau 6) ainsi que des séquences complémentaires de 15 nucléotides qui serviront à recirculariser les fragments linéaires mutés obtenus par PCR. Les produits d'amplification ainsi obtenus ont ensuite été séparés sur un gel à 1 % d'agarose puis purifiés de celui-ci grâce au kit NucleoSpin® « Gel and PCR Clean-up » du fournisseur New England BioLabs®.

6.2.2.2. Transformation bactérienne et amplification des séquences mutantes

Afin d'amplifier tous les plasmides pour réaliser les expériences prévues, des transformations bactériennes ont été réalisées. Pour ce faire, 20 µL de bactéries E.*Coli* compétentes Stellar™ de chez Takara ont subi un choc thermique pour perméabiliser leur membrane afin qu'elle puisse intégrer une partie des 50 ng de plasmide déposés dans le même tube. Après 30' dans la glace, les bactéries ont été incubées 2' à 45 °C puis remises 10' dans la glace. Après complémentation avec 100 µL de milieu SOC (Super Optimal medium with Catabolic repressor), elles ont été incubées 1 h à 37 °C et étalées sur un milieu solide en boîte de pétri constitué de 2.5 % de Luria Broth et 1.5 %

d'agarose et complété à 50 µg. mL^{-1} de kanamycine 24 h à 37 °C. Ensuite, les colonies bactériennes ayant survécu à ce traitement antibiotique ont été prélevées et cultivées dans du milieu LB liquide sous agitation durant 12h à 37 °C. L'ADN plasmidique a enfin été purifié grâce au kit Monarch® Plasmid DNA Miniprep, en suivant les instructions du fournisseur New England BioLabs™. De plus grandes quantités de plasmides ont été produites par la suite à l'aide du kit « plasmid maxi » de chez Qiagen.

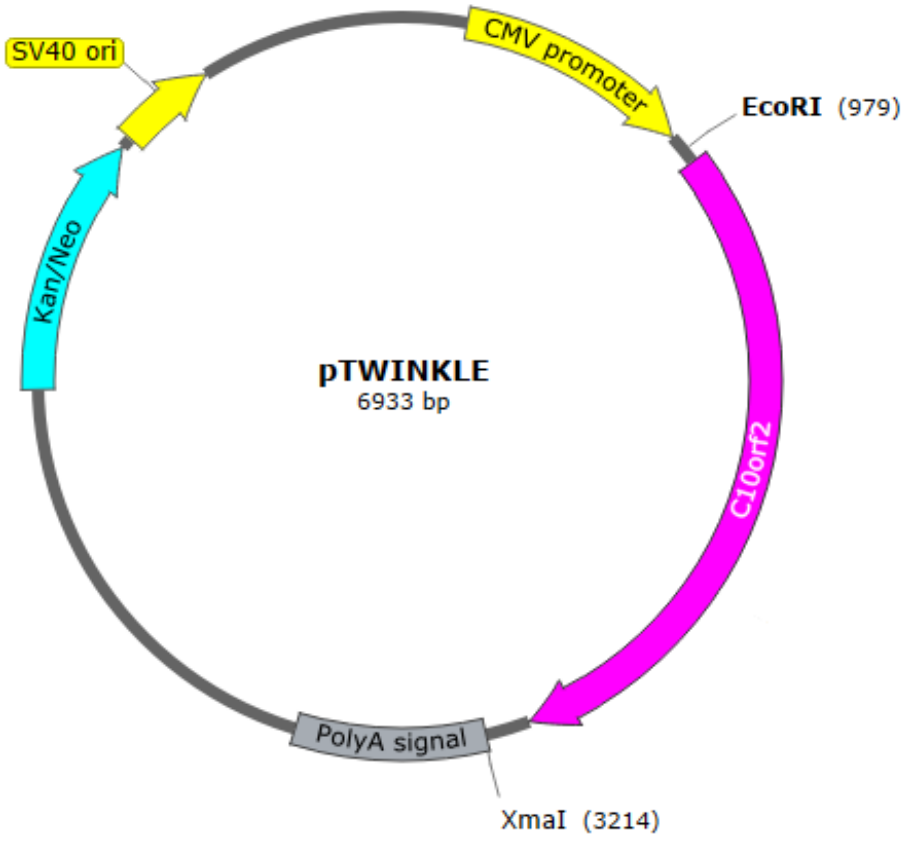


Figure 76 : Carte du plasmide contenant la séquence codante de *TWNK*

Les sites de restriction enzymatique par EcoRI et XmaI utilisés pour le clonage sont représentés, ainsi que les gènes de résistance à la kanamycine et néomycine, la séquence permettant la polyadénylation de l'ARN messager une fois transcrit, assurant sa stabilité, l'origine de réplication du virus SV40 pour maintenir un grand nombre de copies dans les cellules, le promoteur du CytoMégaloVirus (CMV) afin de maintenir une expression forte et bien bien sûr la séquence d'intérêt : *TWNK*, anciennement désignée *C10orf2*.

6.2.2.3. Clonage des séquences *TWNK* mutantes dans pIRES2-eGFP

Afin d'intégrer les séquences codant pour les variants de TWINKLE précédemment obtenues dans un nouveau vecteur d'expression pIRES2-EGFP (6029-1) de chez Clontech, les plasmides ont été digérés par 10 U des enzymes de restriction EcoRI et

XmaI dans du tampon Cutsmart® pendant une heure à 37 °C. Après dénaturation des enzymes à 80 °C pendant 15 min, 100 ng de plasmide linéarisé pIRES2-EGFP (à 50 ng/µL) ont été mélangés à 80 ng (dilué dans 2 µL) d'inserts TWINKLE d'intérêt avec 4 µL d'H_2O et 2 µL de 5X In-Fusion Enzyme Premix (In-Fusion® HD Cloning Kit, Takara), puis incubés à 50 °C pendant 30 min. Le vecteur pIRES2-EGFP permet une expression forte des séquences de *TWNK* avec ou sans variant grâce au promoteur et à l'enhancer CMV. Il présente un gène de résistance à la néomycine et un à la kanamycine, nécessaires à la sélection clonale des bactéries transformées. Ce plasmide présente également une séquence codante de l'eGFP, séparée de la zone d'insertion du gène d'intérêt par la séquence IRES, ce qui permet à l'eGFP d'être exprimée dans le cytosol sans altérer la structure de TWINKLE, comme pourrait le faire une fusion à la GFP en C-terminal, ni son adressage vers la mitochondrie grâce à son MTS.

6.2.3. Culture cellulaire

6.2.3.1. UACC-62

Après différents tests sur les cellules disponibles dans notre laboratoire telles que les HEK-293, les HCT-116 ou les UACC-62, il s'est avéré que ces dernières présentaient le taux de transfection maximal. Il s'agit de cellules issues d'un mélanome humain, un cancer des mélanocytes, des cellules de la peau responsable de la sécrétion de l'essentiel de la mélanine.

Ces cellules ont été cultivées avec du milieu de culture contenant du DMEM (Pan Biotech P0403500) supplémenté avec 10 % de Sérum de Veau Fœtal (SVF) et 1 mM de L-Glutamine, dans un incubateur à 37 °C sous atmosphère humide et à 5 % de CO2.

6.2.3.1. Fibroblastes

Nous avons pu obtenir des fibroblastes primaires issus de biopsies de peau pour le patient porteur de la mutation Y506C-Twinkle ainsi que son père. Après réception, les fibroblastes ont été maintenus en culture dans un milieu complet Gibco™ : DMEM-F12 complémenté de 25 % du mélange AmnioMax™/complément C-100, 10 % de SVF, 1 % d'uridine et 1 % de pyruvate.

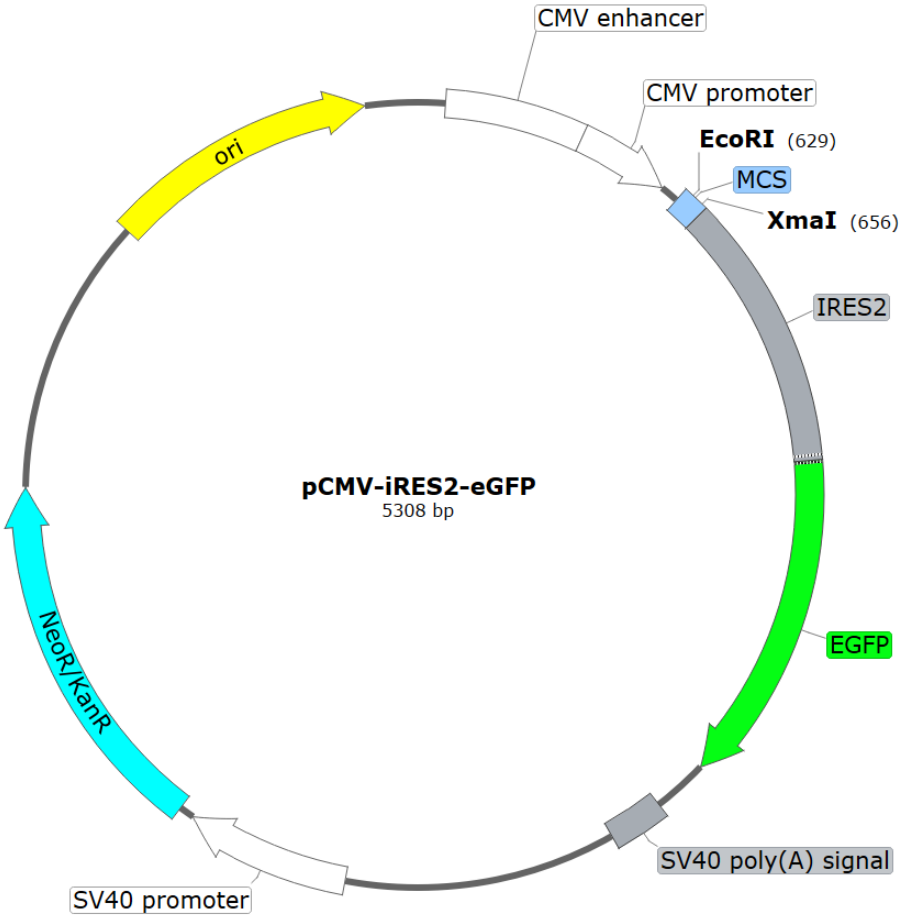


Figure 77 : Carte du plasmide d'expression pIRES2-eGFP

Ce plasmide est composé des mêmes éléments que celui contenant Twinkle, en plus du promoteur de SV40 pour les gènes de résistance, un enhancer du CMV pour exprimer encore plus la séquence d'intérêt ultérieurement clonée au vecteur. Celle-ci sera séparée de la séquence codant l'eGFP par une IRES (Internal Ribosome Entry Site) qui permet une traduction interne et donc l'expression de deux protéines à partir du même vecteur.

6.2.4. Traitement des cellules

6.2.4.1. Transfection

Afin de transfecter les plasmides pIRES2-eGFP dans lesquels ont été clonées les cds de Twinkle wild-type ou portant une des mutations étudiées, différents types de lipofectants disponibles au laboratoire ont été testés : avalanche® everyday, lipofectamine® 2000, jetprime®, trans-IT® 2020, trans-IT® LT1 et enfin trans-IT® X2. Grâce à ces tests nous avons mis en évidence une cytotoxicité amoindrie avec le trans-IT® X2 de chez Mirus Bio, qui a donc été utilisé pour la majorité des transfections.

Afin d'être transfectées, les cellules ont été trypsinées et ensemencées en plaque 6 puits à 500.000 cellules par puit dans le milieu de culture. Après 24 h à 37 °C (60-70 % de confluence), les cellules sont transfectées grâce au lipofectant trans-IT® X2 (MirusBio™), qui encapsule l'ADN d'intérêt en nanoparticules lipidiques fusionnant avec la membrane des cellules pour libérer le vecteur d'expression au niveau du cytosol. Pour cela, 2 µg d'ADN et 2 µL d'agent transfectant sont ajoutés dans 200 µL de DMEM. Le complexe ainsi formé est incubé 30 minutes à température ambiante avant d'être déposé sur les cellules qui sont ensuite replacées dans l'incubateur à 37 °C pour environ 14 h avant que le milieu ne soit changé pour diminuer la cytotoxicité liée au transfectant et aux plasmides transfectés (les quantités de cellules et de réactif sont divisées par 4 pour une transfection en chambre ibidi® 4 puits). Les manipulations sont réalisées 48 h après la transfection pour avoir le meilleur taux de cellules ayant intégré le plasmide.

6.2.4.2. Marquages live en chambres Ibidi®

Afin d'observer le réseau et l'ADN des mitochondries 24h après ensemencement de la chambre Ibidi® avec les fibroblastes des patients ou 48 h après transfection des cellules UACC-62, les cellules sont incubées dans du milieu contenant 250 nM de TMRM (Thermo Scientific™, T668) ainsi que 1 µL de la solution 1X de Picogreen (Thermo Scientific™, P7589) pour 500µL de milieu pendant 15 minutes à 37 °C. Les cellules sont ensuite rincées et replacées dans du milieu de culture. Les acquisitions de fluorescence du Picogreen (Ex : 488 nm, Em : 510 nm) et du TMRM (Ex : 578 nm, Em : 599 nm) sont alors réalisées sur un microscope confocal à épifluorescence TCS–SP8 (Leica Microsystems). Les images sont ensuite analysées et traitées avec les logiciels Huygens™ (Scientific Volume Imaging) et Imaris (Oxford Instruments).

6.2.4.3. Tri cellulaire

Les taux de cellules ayant intégré les plasmides ont d'abord été évalués à l'Incucyte®, un système automatisé de capture d'image de plaques de culture en incubateur après excitation de l'eGFP exprimée dans les cellules ayant intégré le plasmide. Ensuite, les cellules transfectées ont été triées du reste de la population adhérant aux plaques de culture via FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorting), après excitation à 488 nm.

Les cellules triées ont ensuite été conservées sous forme de culot sec à -80 °C (les cellules eGFP-négatives servant de contrôles), en vue d'une future extraction ADN.

6.2.4.4. Déplétion de l'ADNmt au BET

Afin de stimuler la réplication d'ADNmt dans les fibroblastes, et ainsi déterminer si la mutation Y506C de Twinkle a un impact sur ce processus, nous avons utilisé une méthode de déplétion de ce génome au bromure d'éthidium (BET). En effet, cet intercalant à l'ADN a été implémenté dans le milieu de culture à hauteur de 62,5 nM tous les jours durant 3 jours dans 3 plaques 6 puits différentes (triplicatas de manipulation), pour chaque type cellulaire (fibroblastes du patient, de son père et 3 témoins). Ensuite le milieu a été changé et la moitié des cellules a été réservée pour faire des culots secs et extraire l'ADN. Des cellules ont ainsi été prélevées tous les 3 jours durant 12 jours afin de déterminer la cinétique de repeuplement de l'ADNmt par qPCR.

6.2.5. ADN

6.2.5.1. Amorces

La liste des amorces nucléotidiques utilisées chez l'Homme est présentée dans le (**Tableau 19**).

Tableau 19 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour initier les PCR sur cellules humaines

Espèce	Manipulation	Amplicon	Amorces en 5'→3'	Référence
Humain	Intégrité de l'ADNmt (amorces extérieures)	Zone 1	AACAAAGAACCCTAACACCAG AGTCATGTTAGCTTGTTTCAGG	J. Neuhaus *et al.*, 2014
		Zone 2	CCCACTCCCATACTACTAATCTC AGATGGTAGAGTAGATGACGG	
		Zone 3	FACCCATCCCTGAGAATCC CTGGTGAGTAGTGCATGG	
		Zone 4	ACATAAGCTTCTGACTCTTACC TTCTAGTCAGGTTAGGTCTAGG	
		Zone 5	TTACACTATTCCTCATCACCCA GTATGATATGTTTGCGGTTTCG	
		Zone 6	TCGCTTCATTCATTGCCC CGTACAATATTCATGGTGGCT	
		Zone 7	CAGCCCTCCTAATGACCT ATGCTAGGGTAGAATCCGA	
		Zone 8	CCCTACTATGCCTAGAAGGA AATAGTCCTGTGGTGATTTGG	
		Zone 9	CCCACAGCCTAATTATTAGCA TGTAGTAAGGGTGGAAGGTG	

		Zone 10	AAACCCTCATTCACACGAG TGTCTTTGGATATACTACAGCG	
		Zone contrôle	GAGCACCCTATGTCGCAGTA CGGTGTGTGTGTGCTGGGTA	
	Intégrité de l'ADNmt (amorces intérieures)	Zone 1	TTTATCTTTAGGCGGTATGCAC GCTTGTTTCAGGTGCGAG	
		Zone 2	CCATCCTACCCAGCACAC GGGATTAATTAGTACGGGAAGG	
		Zone 3	AAATTCTCCGTGCCACCT AGTCCTGTGGTGATTTGG	
		Zone 4	GCTCGCATCTGCTATAGTG AGGTCTAGGAGGAGTAGGG	
		Zone 5	AACACAAACTACCACCTACC CGATGATGTGGTCTTTGGAG	
		Zone 6	CCTCCAAATATCTCATCAACAACC CAGTAATGTACGAAATACATAGCGG	
		Zone 7	CTAGCCATGTGATTTCACTTCCA AGTTTGTTGGTTAGGTAGTTGAGG	
		Zone 8	CTACTCTCATAACCCTCAACACC GTGGTGATTTGGAGGATCAGG	
		Zone 9	CAACAACCTATTTAGCTGTTCC TTTATCGGAATGGGAGGTG	
		Zone 10	CTCATGTTCATACACCTATCCC GCGATGGCTATTGAGGAG	
	Mutagenèse dirigée de *TWNK*	A955G => K319E	AAGCCGCCGAGTTGTTTGC ACAACTCGGCGGCTTCC	
		A551G => K184R	CCTTACCAGGGTTACAGATGACACAC GTAACCCTGGTAAGGCCAAACATTG	
		A712G => I238V	AAACCACTGTTCCCCGACCC GGGGAACAGTGGTTTCCTCG	
		A1517G => Y506C	CCTTACCAGGGTTACAGATGACACAC GTAACCCTGGTAAGGCCAAACATTG	
	Nombre de copies d'ADNmt	ND1	CCCTAAAACCCGCCACATCT GAGCGATGGTGAGAGCTAAGGT	
		B2M	CAGCTCTAACATGATAACC CCTGTAGGATTCTTCTTTC	

6.2.5.2. Nested PCR

Les délétions étant particulièrement difficiles à observer en culture cellulaire, nous avons utilisé un protocole de « Nested PCR » afin d'augmenter la spécificité et la sensibilité de l'amplification de l'ADN. Elle implique deux cycles successifs de PCR utilisant deux jeux d'amorces nichées.

Ici nous avons ciblé 10 régions de l'ADNmt connues pour générer des délétions[330] avec des couples d'amorces spécifiques (

Tableau 6) afin de savoir si la mutation Y506C de Twinkle pouvait induire une instabilité de cet ADN lors d'une réplication potentiellement altérée). Les échantillons ont été préparés et amplifiés comme indiqué dans les tableaux ci-dessous, respectivement (

Tableau 20,

Tableau 21) pour la « OUT » et (**Tableau 22**, **Tableau 23**) pour la « IN » avant d'être déposés sur gel d'agarose.

Tableau 20 : Préparation pour Nested PCR « OUT »

Volume (µL)	Réactif
10	DreamTaq Green PCR Master Mix
4.4	H_2O
1.6	Mix amorces (10 µM)
4	ADN (20 ng)

Tableau 21 : Programme de Nested PCR « OUT »

Cycles	Température (°C)	Temps
1	94	3′
30	94	15″
	67	15″
	72	15″

Tableau 22 : Préparation pour Nested PCR « IN »

Volume (µL)	Réactif
10	DreamTaq Green PCR Master Mix
4.4	H_2O
1.6	Mix amorces (10 µM)
4	ADN issu de l'amplification « OUT »

Tableau 23 : Programme de Nested PCR « IN »

Cycles	Température (°C)	Temps
1	94	3′
40	94	15″
	67	15″
	72	15″

6.3. Résultats Préliminaires

6.3.1. Analyse de l'impact de la mutation Y506C de Twinkle sur l'ADNmt et le réseau mitochondrial

6.3.1.1. Etude des variants de *TWNK* identifiés sur modèle cellulaire UACC-62

Afin d'évaluer l'impact des variants de *TWNK* identifiés sur la quantité d'ADNmt par deux approches (comptage nucléoïdes et détermination du nombre de copies par qPCR), 8 conditions de transfection ont été mises en place : sans ADN plasmidique, plasmide pCMV-EGFP-N1, plasmide pCMV-IRES2-eGFP, et ce même plasmide portant soit la séquence codante sauvage de *TWNK*, soit les variants I238V, K184R et Y506C, ainsi que la mutation K319E de *TWNK*, qui est connue pour impacter la réplication de l'ADNmt.

Pour évaluer la quantité de nucléoïdes, 48h après transfection avec les différents plasmides, les cellules ont été visualisées au microscope confocal à épifluorescence après avoir été incubées avec du Picogreen® et du TMRM® pour marquer respectivement l'ADNmt dans les nucléoïdes en vert ainsi que les mitochondries en rouge (**Figure 78**). Une dizaine de sélections de plans focaux pour chaque condition a été capturée sur 5 jours différents. Nous avons ainsi pu observer que la surexpression de Twinkle sauvage et des variants I238V et Y506C induit de manière reproductible une agrégation massive des nucléoïdes. De manière intéressante, ce phénotype n'est pas retrouvé pour le variant K184R ainsi que le variant K319E, qui montrent un pattern régulier de distribution des nucléoïdes. Malgré tout, ce résultat a remis en cause notre approche de quantification des nucléoïdes, puisqu'il est impossible de déterminer combien sont présents dans les agrégats.

Nous avons donc réalisé un tri cellulaire après transfection basé sur l'expression de l'eGFP, afin d'évaluer le nombre de copies d'ADNmt en fonction du variant transfecté.

Cette approche n'a pas montré de différence significative entre la condition contrôle et toutes les autres, sans doute de par le faible effectif testé (n = 3) et les écarts types importants (**Figure 79 A**).

Afin d'évaluer un éventuel impact de la mutation Y506C sur l'intégrité de l'ADNmt après transfection, nous avons utilisé une approche de PCR nichée qui permet de screener 10 régions distinctes de l'ADNmt pour y détecter des délétions potentielles[330,331] sur les cellules triées contrôles (plasmide sans séquence *TWNK*), Twinkle sauvage et Y506C-Twinkle. L'amplification d'une portion de la D-loop est un contrôle positif de la double PCR qui doit donner un signal systématiquement. Cette approche n'a révélé qu'une seule bande avec les amorces de la région 8 de l'ADNmt, qui est présente systématiquement, suggérant que cette délétion est intrinsèque au modèle UACC-62 et ne dépend pas de la surexpression de Twinkle ou de son variant Y506C (**Figure 79 B**).

6.3.1.2. Etude sur les fibroblastes porteurs du variant Y506C-Twinkle (le patient et son père)

Nous avons pu ensuite obtenir des fibroblastes du patient atteint d'une AOD et de son père, non atteint. Tous deux sont porteurs du variant Y506C de Twinkle.

L'objectif était de définir si cette mutation a un impact sur la quantité et la qualité de l'ADNmt, ainsi que sur la capacité réplicative de l'hélicase. Nous avons aussi cherché à déterminer si cette mutation exerce une quelconque influence sur le réseau mitochondrial, les AOD étant souvent causées par des protéines de la dynamique mitochondriale. De plus, en comparant les résultats du patient et de son père, si un effet de la mutation Y506C était observé chez ce dernier, la possibilité d'une pénétrance incomplète de la mutation pourrait être envisagée.

Les services de Génétique et de Biochimie du CHU d'Angers ont réalisé une exploration de l'ADNmt et des paramètres de respiration mitochondriale sur ces deux lignées primaires de fibroblastes (patient et son père). Aucune anomalie de nombre de copies ou perte d'intégrité de l'ADNmt n'ont été observées, ni une atteinte fonctionnelle (données diagnostiques non-montrées).

Les fibroblastes étant un modèle très éloigné des CGRs, en termes de fonction et structure, nous avons émis l'hypothèse que cette absence de différence pourrait être due à des besoins énergétiques très différents, et que les fibroblastes, peu challengés métaboliquement et adaptés aux conditions de culture, ont un turnover d'ADNmt plus réduit, et supportent mieux la mutation de Y506C de Twinkle. Nous avons donc mis en place un protocole de déplétion-réplétion d'ADNmt afin de stimuler la réplication et donc

l'utilisation de l'hélicase Twinkle. Les cellules contrôles et deux porteurs de la mutation Y506C ont été traitées pendant 4 jours avec du bromure d'éthidium (BET) à 62.5 nM (les concentrations double et quadruple étant cytotoxiques), puis incubés avec un milieu dépourvu de cet agent intercalant, afin qu'elles re-synthétisent de l'ADNmt. Tous les 3 jours jusqu'à J 13, les fibroblastes ont été récupérés pour en extraire l'ADNmt et analyser par qPCR le nombre de copies d'ADNmt.

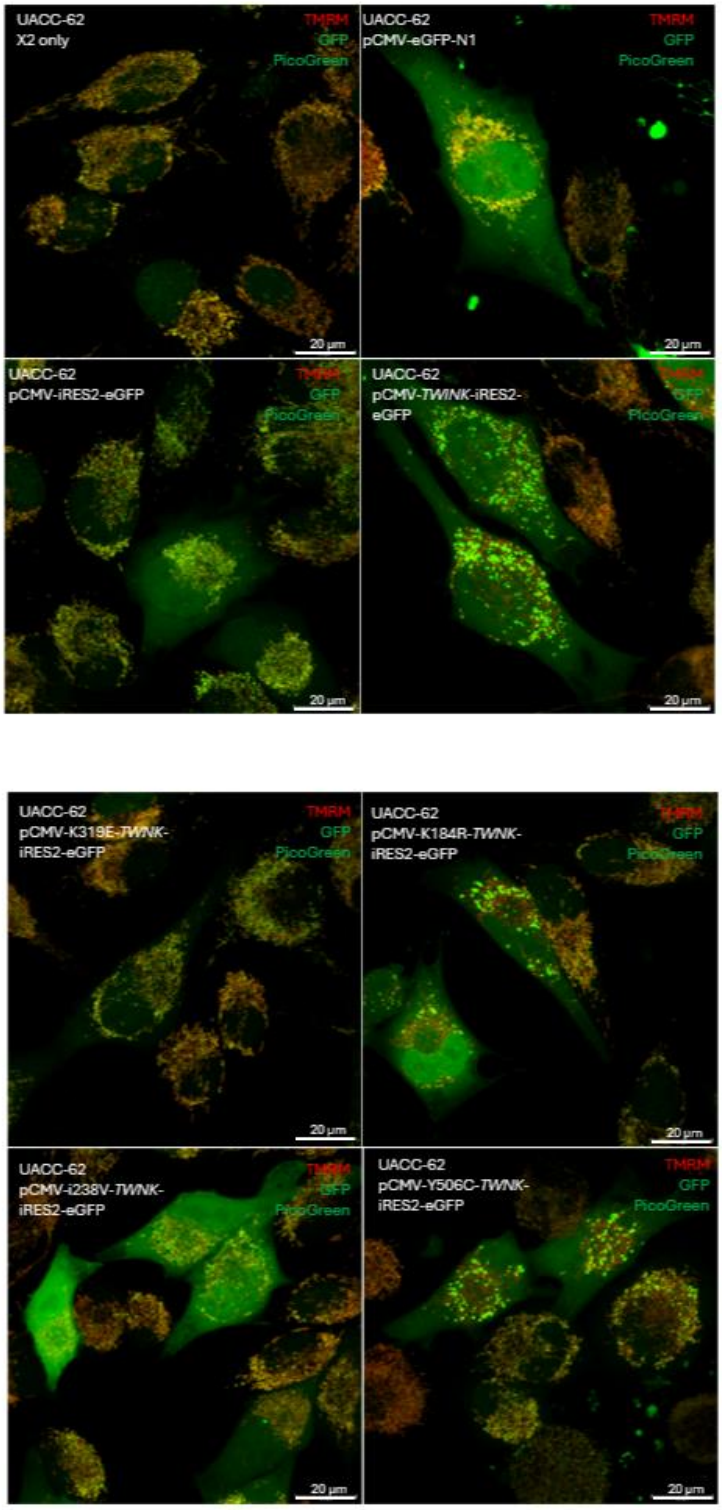


Figure 78 : Observation au microscope confocal à épifluorescence du réseau mitochondrial et de la structuration des nucléoïdes d'UACC-62 transfectées avec différents variants de *TWNK*

Co-marquages des mitochondries (TMRM) et de l'ADNmt (Picogreen™) effectués dans des UACC-62, observés 48h après transfection soit sans vecteur d'expression, soit avec un vecteur GFP indépendant sans IRES, soit avec le vecteur pCMV simple avec IRES-eGFP, soit avec la cds de TWNK, sauvage ou portant les mutations K319E, I238V, K184R, et Y506C. Environ 5 images sont prises par n=6 manipulations.

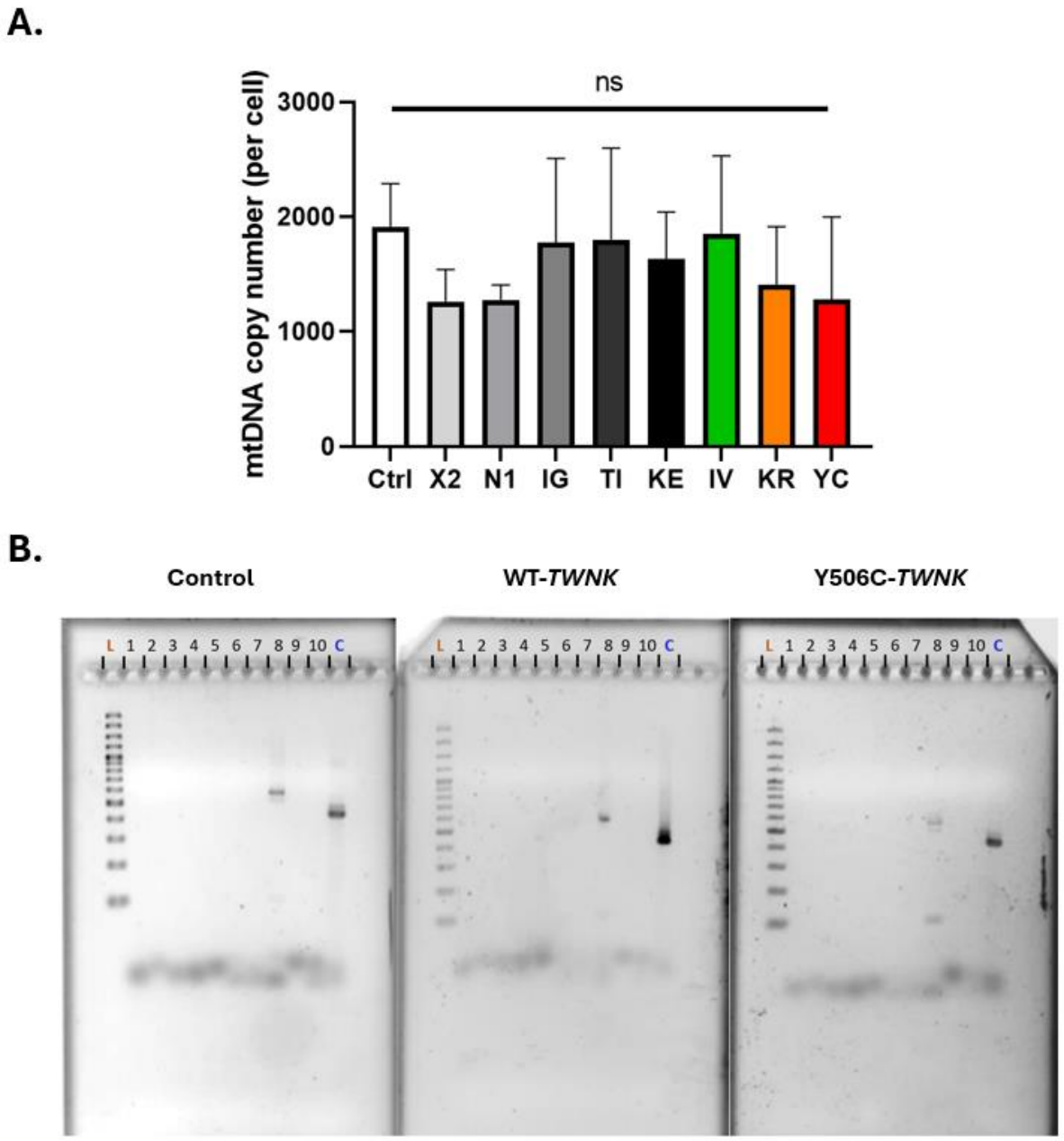


Figure 79 : Impact des variants de *TWNK* transfectés en UACC62 sur la la quantité d'ADNmt et son intégrité

A) Quantification par qPCR du nombre de copies d'ADNmt dans les UACC-62 transfectées avec l'un des plasmides mentionnés ci-dessus. n = 3. **B)** Produit de 2x35 cycles d'amplification (nested-PCR) de 10 régions de l'ADNmt sujettes à délétions, et de la D-loop sur les cellules transfectées avec le pCMV-IRES seul, ou portant la cds de *TWNK* sauvage ou Y506C-*TWNK*, migrés en gel d'agarose 2 %. n = 3.

La première observation est que les fibroblastes du patient sont plus sensibles à la déplétion, puisqu'après 4 jours de traitement au BET, leur quantité d'ADNmt s'est effondrée quasiment complètement, alors qu'il reste environ 25 % et 40 % d'ADNmt chez le père et le contrôle respectivement (**Figure 80 A**). Chez le père, il y a une tendance à une déplétion légèrement plus sévère que chez le contrôle, mais non significative. Sur la période de réplétion, il y a une différence nette entre le patient et les deux autres lignées fibroblastiques, puisque à J 13, la quantité d'ADNmt est revenue à la valeur initiale chez l'enfant, alors qu'elle est 1,5 fois et 2 fois plus élevée chez le père et le contrôle respectivement. Il y a une tendance chez le père à être légèrement moins efficace que le contrôle pour repeupler l'ADNmt. Ces observations semblent indiquer que la mutation Y506C a un impact sur l'activité de Twinkle, mais qu'un polymorphisme chez le père en amoindrit l'impact, suggérant une pénétrance incomplète qui expliquerait pourquoi le père n'est pas atteint.

Afin d'aller plus loin nous avons évalué l'impact du variant Y506C sur le nombre et le volume des nucléoïdes. Les fibroblastes, a l'instar des UACC-62 transfectées, ont été incubés 15 minutes avec du Picogreen® et du TMRM selon les instructions du fournisseur avant d'être observés au microscope confocal à épifluorescence (**Figure 80 B-C**). A ce jour, seule la comparaison entre contrôle et père du patient a été réalisée, et elle ne montre pas de différence significative sur le nombre et le volume des nucléoïdes. A première vue, les images obtenues tout récemment sur les fibroblastes du patient ne révèlent pas d'anomalie, ce qui est en accord avec le résultat des services de diagnostic, à savoir pas de variation de la quantité d'ADNmt chez les fibroblastes Y506C (père et patient).

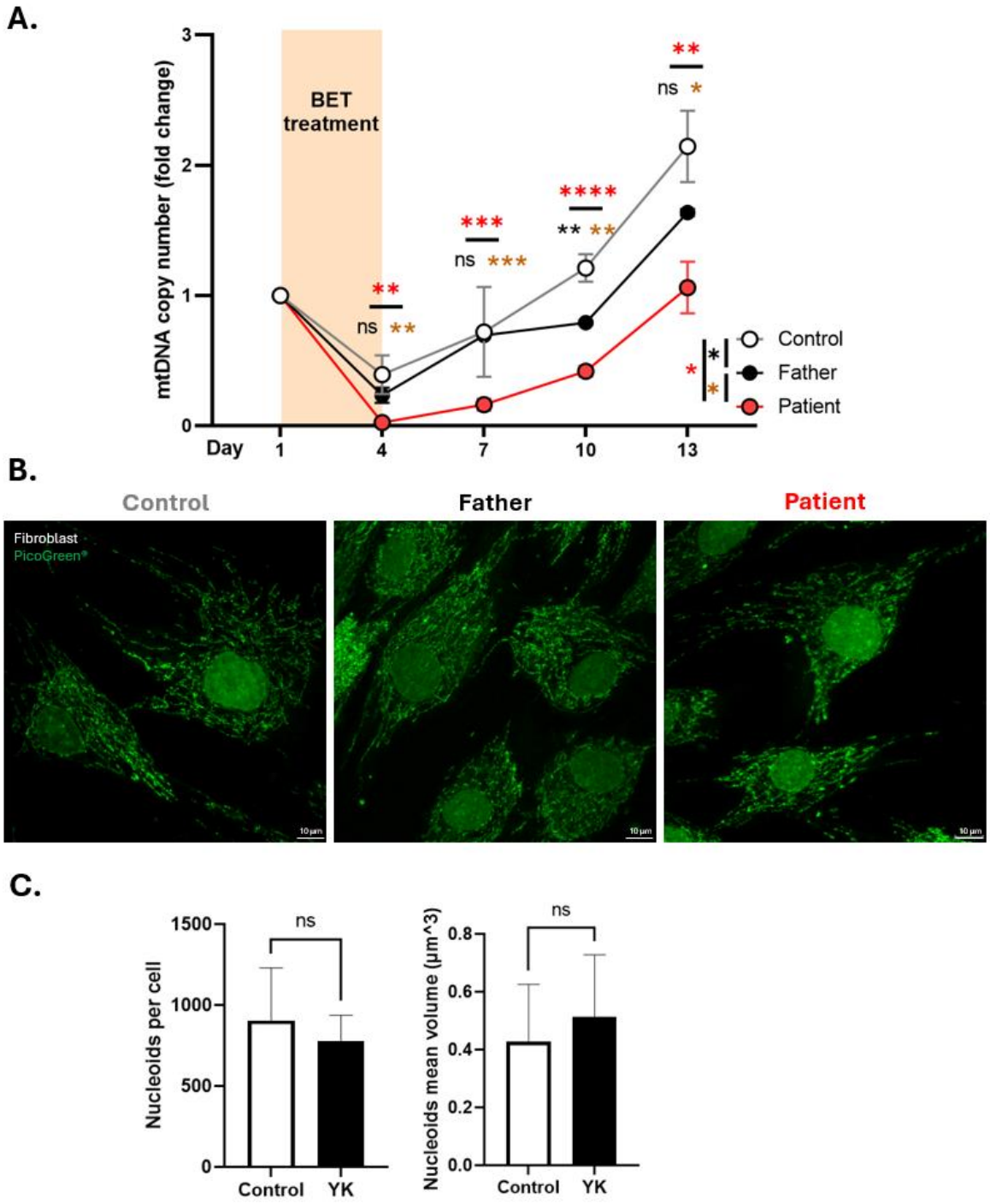


Figure 80 : Impact de la mutation Y506C sur la stabilité de l'ADNmt

A) La réplication de l'ADNmt dans les fibroblastes a été stimulée par déplétion en les incubant 4 jours dans 62.5 nM de BET. Tous les 3 jours un tiers des fibroblastes de la plaque 6 puits dans laquelle ils sont ensemencé est récupéré pour en extraire l'ADN afin d'évaluer par qPCR le nombre de copies d'ADNmt. Cette quantification est obtenue en normalisant les signaux obtenus pour ND1 sur celle ceux obtenus pour B2M. Les valeurs obtenues sont rapportées à celles d'une plaque 6 puit contrôle avec des fibroblastes n'ayant jamais été traités au BET. **B)** Images de fibroblastes capturées au microscope confocal à épifluorescence. L'ADNmt est marqué au Picogreen®. **C)** Après déconvolution et traitement des surfaces via Huygens® et Imaris®, les moyennes du nombre et du volume des nucléoïdes sont extraites d'Imaris®. 3 manipulations ont été effectuées, 3 populations de fibroblastes témoins différentes ont été utilisées.

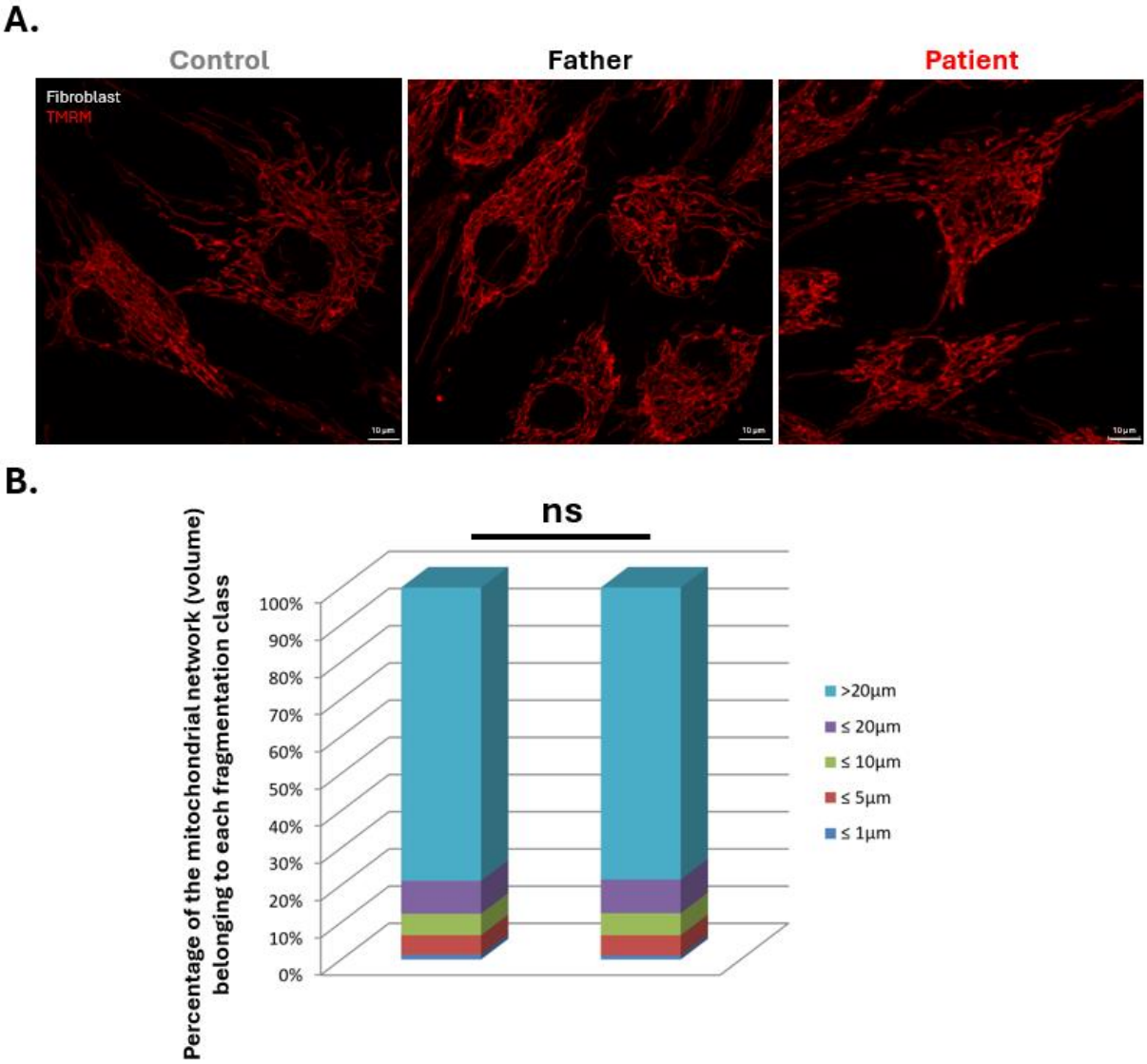


Figure 81 : Impact du variant Y506C de TWINKLE sur la morphologie mitochondriale dans les fibroblastes

A) Images du réseau mitochondrial obtenues au microscope confocal a épifluorescence après 15' d'incubation au TMRM dans les fibroblastes d'un témoin, du père du patient et enfin du patient. **B)** Répartition des mitochondries des témoins et du père du patient par classes de tailles. Les images des plans focaux obtenues au microscope ont été déconvoluées via Huygens®, compilées pour reconstituer un objet 3D, puis une surface a été appliquée au réseau et la taille des surfaces constituant des objets 3d séparés a été analysée, le tout sur Imaris®.

6.3.1.3. Analyse du réseau mitochondrial chez les fibroblastes contrôle et sujets porteurs de la mutation Y506C-TWINKLE

Etant donné que des perturbations de la dynamique mitochondriale sont souvent impliquées dans les AOD, nous avons souhaité évaluer l'impact du variant Y506C sur la structure du réseau mitochondrial. Des différences entre le patient et son père pourraient en effet renforcer l'idée d'une pénétrance incomplète. A première vue, en comparant les images obtenues pour les 3 lignées fibroblastiques, aucune différence notable n'est observable, puisque le réseau apparait fusionné, même chez le patient. La répartition des tailles de mitochondries a été analysée de manière plus précise grâce au logiciel Imaris, après avoir déconvolué les images de fibroblastes ayant subi une incubation de 15 minutes dans le TMRM capturées au microscope confocal.

Le TMRM marquant le réseau mitochondrial en s'accumulant dans la matrice en fonction du potentiel de membrane mitochondrial, une surface virtuelle a pu y être appliquée après reconstruction 3D du réseau grâce aux captures des plans focaux par ordinateur pour ensuite compter et classer les mitochondries par catégories de tailles (**Figure 81**). A ce jour, seule la comparaison entre contrôle et le père du patient a pu être réalisée, et elle confirme l'observation visuelle, à savoir une grande majorité de mitochondries dont la taille est supérieure à 20 µm, sans différence entre les deux types de lignée fibroblastiques.

6.4. Discussion

6.4.1. UACC-62

L'identification de variants de Twinkle, chez des patients diagnostiqués comme étant atteints d'AOD, est intrigante puisqu'ils sont généralement associés à d'autres pathologies telles que la PEO.[332] Pour savoir si ces variants pouvaient être l'origine d'une AOD, une première série d'analyses a été effectuée *in vitro* en attendant la réception des fibroblastes du patient Y506C et de son père. Ce variant a été sélectionné en priorité car prédit comme probablement pathogène par le logiciel Polyphen-2. Cette première analyse a été réalisée en transfectant des plasmides p(variant de)Twinkle-IRES2-eGFP grâce au Trans-IT X2™ de chez Mirus Bio™ dans des cellules UACC-62. La première observation frappante est l'agrégation ou augmentation de taille des nucléoïdes en cas de surexpression de Twinkle, sauvage ou portant les mutations Y506C ou K184R. Cela pourrait être lié à une structuration exacerbée des nucléoïdes par la présence de plus grandes quantités d'hélicase Twinkle, qui agirait alors comme une sorte d'histone

mitochondriale.[333] Toutefois, une telle augmentation de la taille des nucléoïdes avait été observée dans des modèles *in vivo* de surexpression de TFAM et Twinkle. Elle était associée à une augmentation du nombre de copies d'ADNmt dans les tissus, et avait un impact négatif sur l'intégrité de l'ADNmt.[334] Nous n'avons pas observé d'augmentation de la quantité d'ADNmt dans nos modèles transfectés, ce qui va à l'encontre de cette étude *in vivo*.

De plus, le variant K319E, que nous avions inclus comme contrôle positif, n'a pas montré d'effet sur la quantité d'ADNmt dans notre étude, alors que la publication le décrivant montrait une diminution de 60% de la quantité d'ADNmt 48h après son induction dans un modèle de cellules HEK293.[90] C'est effectivement un résultat étonnant, car chez les souris exprimant la forme équivalente murine K320E-Twinkle dans l'épiderme, où la réplication cellulaire est très active, l'ADNmt est déplété à 95 %[257] Il nous faut donc répéter ces expériences pour consolider les données avant de pouvoir conclure. Enfin, l'absence d'agrégation des nucléoïdes par les variants I238V et K319E suggère que les résidus mutés ne participent pas à leur restructuration.

6.4.2. Fibroblastes

Notre analyse des fibroblastes du patient porteur du variant Y506C et de son père a été perturbée, car une contamination des cellules du patient est survenue et a nécessité des étapes de ré-amplification cellulaire, qui ont pris de nombreuses semaines. Ceci explique que certaines analyses chez le patient ne sont pas encore terminées. Toutefois, bien que les analyses effectuées par les services du CHU d'Angers ne montrent pas d'impact sur la stabilité et l'intégrité de l'ADNmt, ni sur la fonctionnalité de la chaine respiratoire, notre protocole de déplétion/réplétion suggère que chez l'enfant, l'hélicase est moins efficace, puisqu'elle permet la production de deux fois moins d'ADNmt à temps égal, en comparaison avec les fibroblastes contrôles. De plus, une tendance à une légère différence a été observée entre le père du patient et les fibroblastes contrôles. Cela pourrait suggérer que chez ce dernier, l'impact de la mutation Y506C est contrebalancé par un polymorphisme dans un gène modificateur, ou tout simplement que l'allèle muté n'est pas exprimé. Nos résultats ne permettent ni d'affirmer, ni d'exclure que la mutation Y506C est bien impliquée dans la pathologie d'AOD du patient.

6.5. Conclusions-Perspectives

Ces résultats préliminaires sont globalement négatifs, et ne permettent pas à ce jour d'incriminer les variants de Twinkle identifiés dans l'atrophie optique diagnostiquée chez les patients. Malgré tout, le résultat obtenu sur le repeuplement de l'ADNmt post déplétion, qui semble affecté chez le patient Y506C, mérite que l'on explore encore cette piste.

En premier lieu, ces expériences vont être répétées pour conforter ce résultat, et l'analyse finale de la morphologie des nucléoïdes et du réseau mitochondrial sera terminée pour la lignée du patient. Nous allons également mesurer l'expression transcriptionnelle de *TWNK*, afin de déterminer si l'allèle muté est exprimé ou non chez le père, ce qui pourrait être en faveur d'une pathologie dominante à pénétrance incomplète. Il est prévu de cultiver les fibroblastes Y506C sur milieu en galactose, pour forcer l'utilisation du métabolisme mitochondrial. Enfin, une approche intéressante serait de différencier les fibroblastes Y506C et contrôles en CGR, en passant par une approche iPSC, ou en neurones par transdifférenciation, car ce type de cellules sera certainement plus sensible à des atteintes mitochondriales, et cela permettrait de monitorer d'éventuelles altérations de la maintenance de l'ADNmt sur cellules différenciées, ce qui est difficile sur cellules à fort potentiel réplicatif.

7.Annexes

7.1. Colorations COX/SDH dans les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo}, *Drp1*$^{+/-}$, *Opa1*^{delTTAG} et doubles mutants de 18 mois

Le modèle K320E-Twinkle^{Myo} offre l'opportunité de voir les effets de la mutation de Twinkle à la fois dans le cœur et les muscles, c'est pourquoi des colorations COX/SDH ont également été effectuées sur ce tissu (**Figure 82**). L'augmentation statistiquement significative de la quantité de cellules COX^{-} observées dans le cœur des individus K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*^{delTTAG} a été confirmée au niveau du soléaire et du tibial antérieur, et la même tendance est observée dans le gastrocnémien.

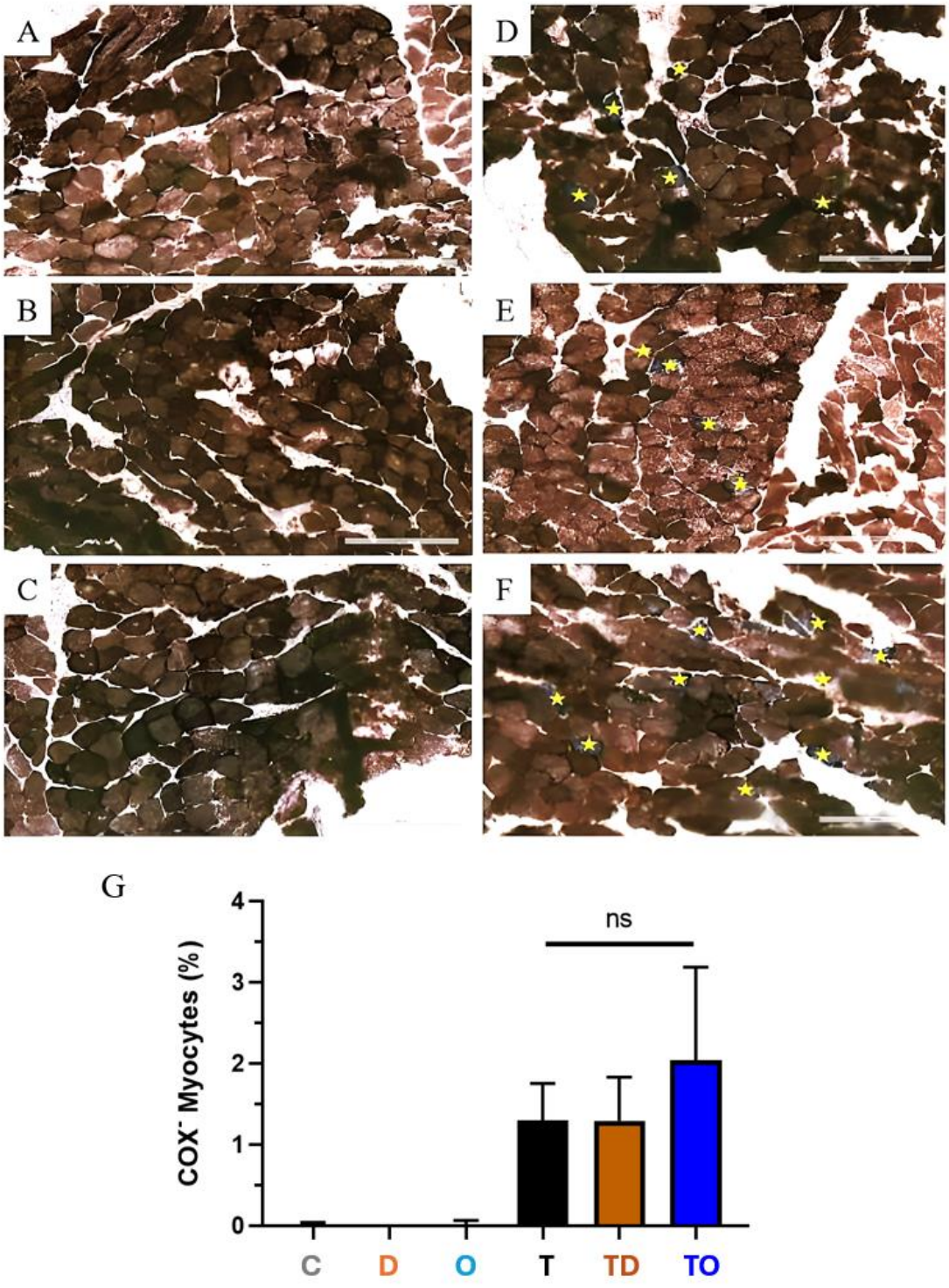


Figure 82 : Coupes de soléaires ayant subi une double coloration enzymatique COX/SDH chez les animaux WT et K320E-Twinkle^{Myo} dotés ou non des génotypes *Drp1*$^{+/-}$ ou *Opa1*^{delTTAG}

Les cellules COX^{-} sont bleues et indiquées à l'aide d'une étoile jaune sur les coupes de muscle de souris **A)** Contrôles, **B)** *Drp1*$^{+/-}$, **C)** *Opa1*^{delTTAG}, **D)** K320E-Twinkle^{Myo}, **E)** K320E-Twinkle^{Myo}-*Drp1*$^{+/-}$, **F)** K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1*$^{+/-}$. **G)** Le pourcentage de cellule COX^{-} a été compté pour le gastrocnémien en plus du soléaire et du tibialis antérieur et montre la même tendance d'augmentation de cellules COX^{-} chez les TO, mais les résultats sont à renforcer en incluant de nouveaux animaux.

7.2. Observation de regroupement de mitochondries sous-sarcolemmales chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois

Afin d'évaluer la présence de RRFs et une éventuelle prolifération mitochondriale dans les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo}, nous avons réalisé des colorations au Trichrome de Gomori (coupes sagittale, **Figure 82 A**) et des observations au MET (coupes longitudinales, **Figure 82 B**). La coloration au trichrome de Gomori a été effectuée comme suit : les coupes transversales congelées de 10 µm d'épaisseur ont été séchées à l'air 10', colorées à l'hématoxyline de Harris 8' rincées deux fois à l'eau ultra pure. Les sections ont ensuite été incubées 30' avec une solution de trichrome puis rincées une fois à l'eau acétifiée, une fois à l'eau courante. Les sections ont ensuite été déshydratées et clarifiées dans un bain d'éthanol 100 % puis de xylène 100 % pour enfin être montées sur lame au baume du Canada. On observe bien la présence de RRFs, avec accumulation mitochondriale visible en rouge à la périphérie de certaines fibres, et des amas mitochondriaux subsarcolemmaux sur les images de microscopie électronique.

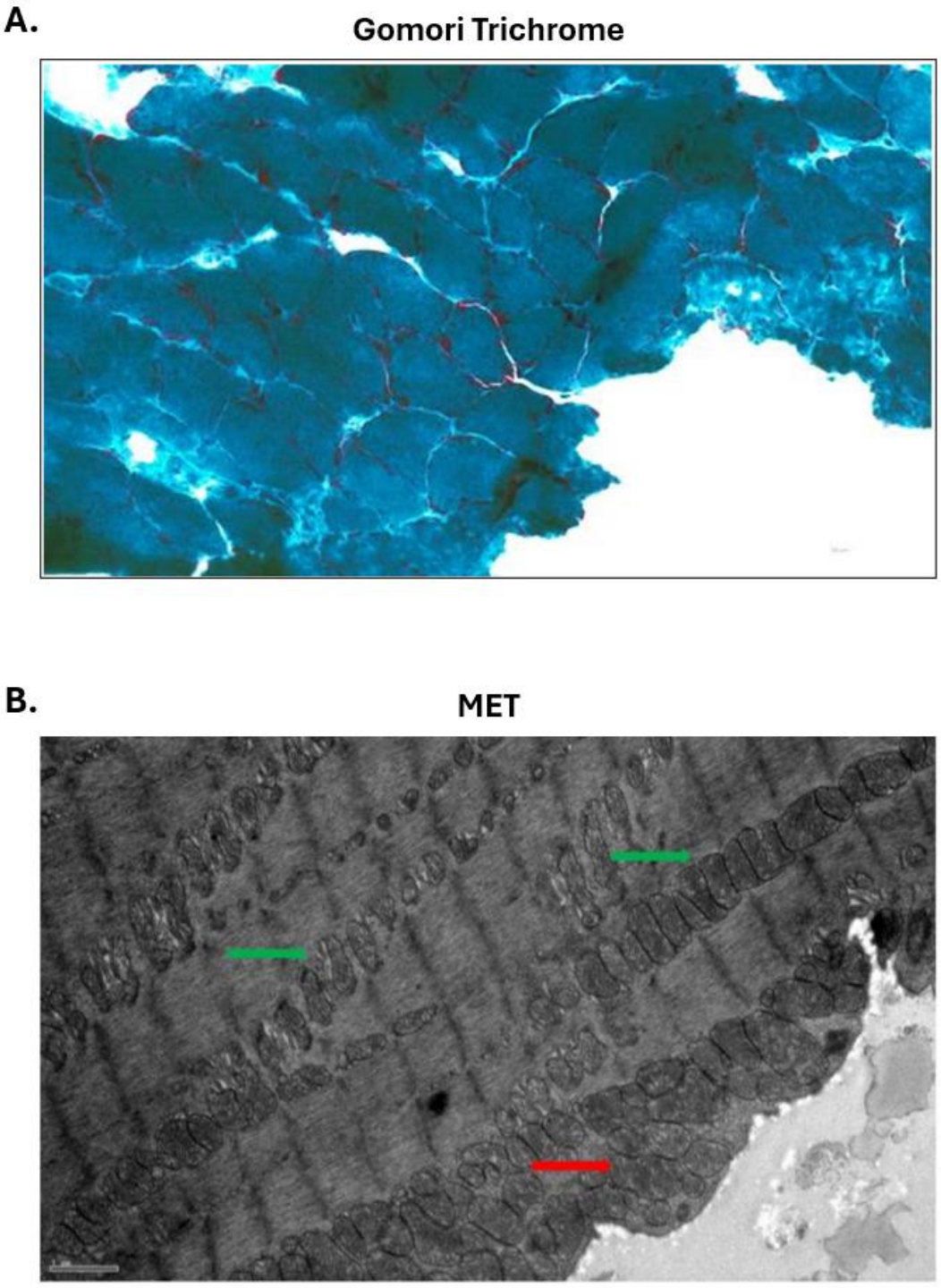


Figure 83 : Observation de regroupement de mitochondries anormales dans les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo}

A) Observation au scanner d'une coloration au trichrome de Gomori de coupe sagittale de soléaire de souris de 18 mois mettant en évidence les mitochondries en rouge, qui s'accumulent en périphérie des myocytes, au niveau du sarcolemme. Phénomène observable également sur les autres types de fibres musculaires chez K320E-Twinkle^{Myo}. **B)** Observation au MET d'une coupe longitudinale de soléaire de souris K320E-Twinkle^{Myo} de 18 mois mettant également en évidence la surreprésentation de mitochondries sous-sarcolemmales en extrémité de la coupe. Les mitochondries sous-sarcolemmales sont indiquées par une flèche rouge tandis que les mitochondries intermyofibrillaires sont indiquées par des flèches vertes.

7.3. Observation de fibres musculaires atrophiées, présentant une déficience mitochondriale et en voie de régénération chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois

Afin d'aller plus loin dans l'étude de l'impact de la mutation K320E de Twinkle sur la morphologie des fibres musculaires des souris à 18 mois, des coupes sériées de muscle ayant subi des colorations COX/SDH et à l'hématoxyline-éosine (HE) ont été effectuées.

L'observation combinée de ces deux marquages a permis d'identifier plusieurs affections des fibres musculaires chez la souris K320E-Twinkle^{Myo} de 18 mois, typiques des muscles de patients atteints de pathologies mitochondriales comme le SANDO[85] ou l'AOD « plus »[64]. Ces observations rejoignent celles que nous avions faites précédemment sur le modèle muscle-spécifique K320E-Twinkle^{skm}.[335] Des fibres atrophiques sont observées, ainsi que des noyaux centraux qui attestent d'un processus de régénération musculaire par les cellules satellites.

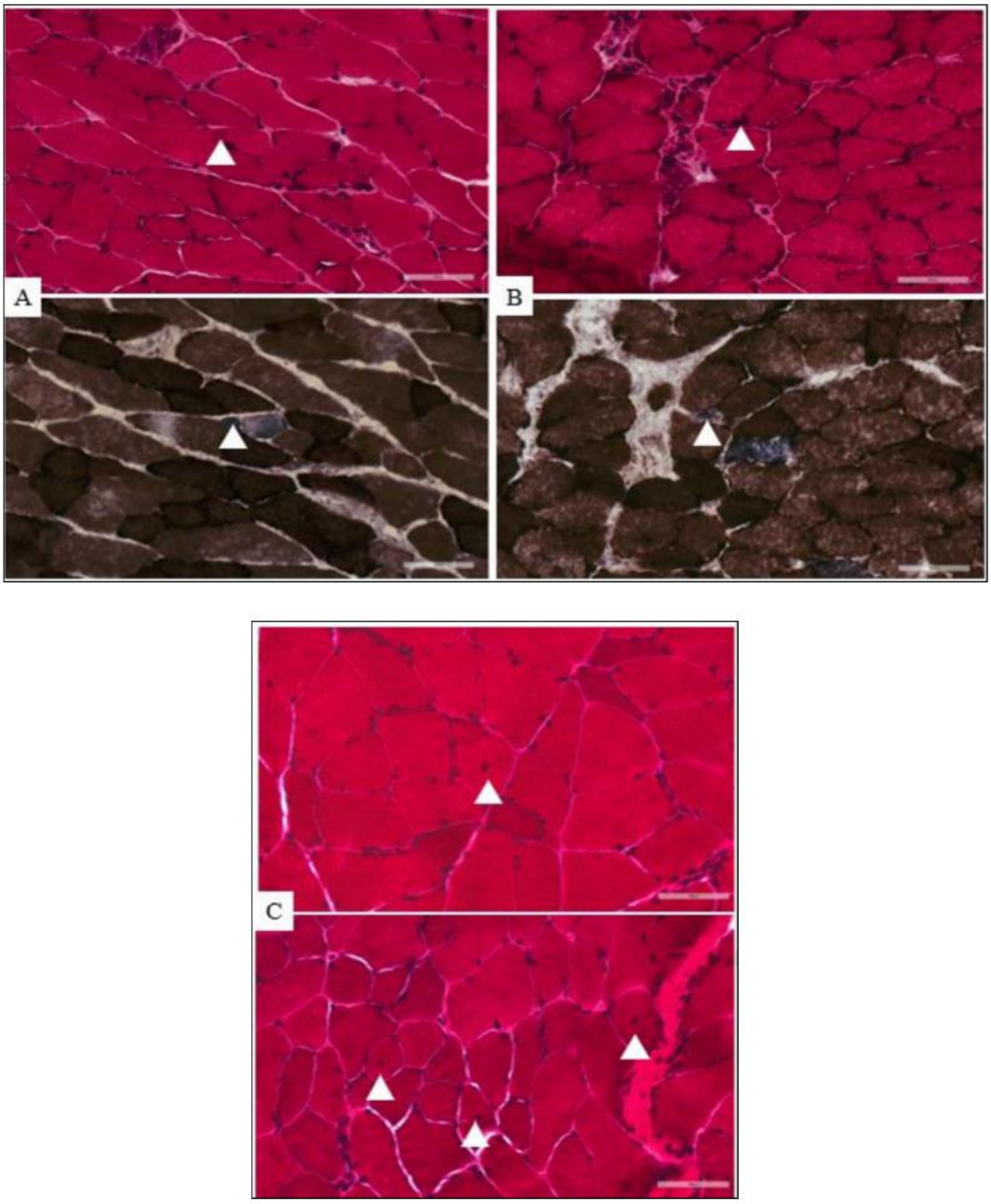


Figure 84 : Observations au scanner de coupes de muscles de souris K320E-Twinkle^{Myo} de fibres musculaires caractéristiques de pathologies mitochondriales

A) Coupes sériées ayant subi une coloration COX/SDH en bas et à l'hématoxyline-éosine (HE) en haut, permettant de mettre en évidence les noyaux en violet sur un fond cellulaire en rouge. Ces coupes sont représentatives d'observations faites chez différentes souris K320E-Twinkle^{Myo}. La flèche indique une fibre musculaire atrophique et en état de COX-déficience. **B)** Coupes sériées indiquant d'une flèche une autre fibre atrophiée, cette fois avec accumulation de mitochondries déficientes. **C)** Coupes colorées à l'HE. Des flèches indiquent des fibres au faible diamètre et présentant des noyaux centraux, caractéristiques des fibres régénérées par les cellules satellites.

Bibliographie

1. Benda, C. Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertebraten, II. Theil: Die Histiogenese der Spermien. *-, Benda, C.: Ueber die Spermatogenese der Vertebraten und höherer Evertebraten, II. Theil: Die Histiogenese der Spermien, -: - -.* https://digitalesammlungen.uni-weimar.de/viewer/metadata/lit6097/1/ (1898).
2. May-Panloup, P., Boguenet, M., El Hachem, H., Bouet, P.-E. & Reynier, P. Embryo and Its Mitochondria. *Antioxidants* **10**, 139 (2021).
3. Rolfe, D. F. & Brown, G. C. Cellular energy utilization and molecular origin of standard metabolic rate in mammals. *Physiol Rev* **77**, 731–758 (1997).
4. Sagan, L. On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* **14**, 255–274 (1967).
5. Gray, M. W. Mitochondrial Evolution. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **4**, (2012).
6. Tzameli, I. The evolving role of mitochondria in metabolism. *Trends in Endocrinology & Metabolism* **23**, 417–419 (2012).
7. The top 10 causes of death. https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/the-top-10-causes-of-death.
8. Baris, O. R. *et al.* Mosaic Deficiency in Mitochondrial Oxidative Metabolism Promotes Cardiac Arrhythmia during Aging. *Cell Metabolism* **21**, 667–677 (2015).
9. Miyamoto, S. Autophagy and cardiac aging. *Cell Death Differ* **26**, 653–664 (2019).
10. Agostini, D. *et al.* An Integrated Approach to Skeletal Muscle Health in Aging. *Nutrients* **15**, 1802 (2023).
11. Jarrett, S. G., Lewin, A. S. & Boulton, M. E. The Importance of Mitochondria in Age-Related and Inherited Eye Disorders. *Ophthalmic Research* **44**, 179–190 (2010).
12. Kauppila, T. E. S., Kauppila, J. H. K. & Larsson, N.-G. Mammalian Mitochondria and Aging: An Update. *Cell Metabolism* **25**, 57–71 (2017).

13. Daum, G. Lipids of mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes* **822**, 1–42 (1985).

14. Cortie, C. H. *et al.* Of mice, pigs and humans: An analysis of mitochondrial phospholipids from mammals with very different maximal lifespans. *Experimental Gerontology* **70**, 135–143 (2015).

15. Comte, J., Maïsterrena, B. & Gautheron, D. C. Lipid composition and protein profiles of outer and inner membranes from pig heart mitochondria. Comparison with microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **419**, 271–284 (1976).

16. Fontanesi, F. Mitochondria: Structure and Role in Respiration. in *eLS* 1–13 (John Wiley & Sons, Ltd, 2015). doi:10.1002/9780470015902.a0001380.pub2.

17. Gohil, V. M. & Greenberg, M. L. Mitochondrial membrane biogenesis: phospholipids and proteins go hand in hand. *J Cell Biol* **184**, 469–472 (2009).

18. Maldonado, E. N. & Lemasters, J. J. Warburg Revisited: Regulation of Mitochondrial Metabolism by Voltage-Dependent Anion Channels in Cancer Cells. *J Pharmacol Exp Ther* **342**, 637–641 (2012).

19. Dj, S. & Dn, H. Protein translocons: multifunctional mediators of protein translocation across membranes. *Cell* **112**, (2003).

20. J, D., P, R. & M, van der L. Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. *Biochimica et biophysica acta* **1833**, (2013).

21. Schatz, G. Mitochondria: beyond oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1271**, 123–126 (1995).

22. Flannery, P. J. & Trushina, E. Mitochondrial Dynamics and Transport in Alzheimer's Disease. *Mol Cell Neurosci* **98**, 109–120 (2019).

23. Schiavon, C. R., Shadel, G. S. & Manor, U. Impaired Mitochondrial Mobility in Charcot-Marie-Tooth Disease. *Front Cell Dev Biol* **9**, 624823 (2021).

24. Granatiero, V. & Manfredi, G. Mitochondrial Transport and Turnover in the Pathogenesis of Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Biology (Basel)* **8**, 36 (2019).

25. Nader, G. A. & Esser, K. A. Intracellular signaling specificity in skeletal muscle in response to different modes of exercise. *J Appl Physiol (1985)* **90**, 1936–1942 (2001).

26. Chin, E. R. *et al.* A calcineurin-dependent transcriptional pathway controls skeletal muscle fiber type. *Genes Dev* **12**, 2499–2509 (1998).

27. Wright, D. C. *et al.* Exercise-induced mitochondrial biogenesis begins before the increase in muscle PGC-1alpha expression. *J Biol Chem* **282**, 194–199 (2007).

28. White, R. *et al.* Role of RIP140 in metabolic tissues: connections to disease. *FEBS Lett* **582**, 39–45 (2008).

29. Seth, A. *et al.* The transcriptional corepressor RIP140 regulates oxidative metabolism in skeletal muscle. *Cell Metab* **6**, 236–245 (2007).

30. Leonardsson, G. *et al.* Nuclear receptor corepressor RIP140 regulates fat accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 8437–8442 (2004).

31. Christian, M. *et al.* RIP140-Targeted Repression of Gene Expression in Adipocytes. *Molecular and Cellular Biology* **25**, 9383 (2005).

32. Kloska, A., Węsierska, M., Malinowska, M., Gabig-Cimińska, M. & Jakóbkiewicz-Banecka, J. Lipophagy and Lipolysis Status in Lipid Storage and Lipid Metabolism Diseases. *International Journal of Molecular Sciences* **21**, 6113 (2020).

33. DeBalsi, K. L., Hoff, K. E. & Copeland, W. C. Role of the mitochondrial DNA replication machinery in mitochondrial DNA mutagenesis, aging and age-related diseases. *Ageing research reviews* **33**, 89 (2016).

34. Brand, M. D. The efficiency and plasticity of mitochondrial energy transduction. *Biochem Soc Trans* **33**, 897–904 (2005).

35. Mitchell, P. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* **191**, 144–148 (1961).

36. Divakaruni, A. S. & Brand, M. D. The regulation and physiology of mitochondrial proton leak. *Physiology (Bethesda)* **26**, 192–205 (2011).

37. Nass, M. M. K. & Nass, S. INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. *J Cell Biol* **19**, 593–611 (1963).

38. Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**, 457–465 (1981).

39. Wallace, D. C. & Chalkia, D. Mitochondrial DNA Genetics and the Heteroplasmy Conundrum in Evolution and Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, (2013).

40. Kukat, C. *et al.* Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 13534–13539 (2011).

41. Kukat, C. *et al.* Cross-strand binding of TFAM to a single mtDNA molecule forms the mitochondrial nucleoid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**, 11288–11293 (2015).

42. Bonekamp, N. A. & Larsson, N.-G. SnapShot: Mitochondrial Nucleoid. *Cell* **172**, 388-388.e1 (2018).

43. Falkenberg, M., Larsson, N.-G. & Gustafsson, C. M. DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**, 679–699 (2007).

44. Larsson, N. G. *et al.* Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* **18**, 231–236 (1998).

45. Samuels, D. C., Schon, E. A. & Chinnery, P. F. Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends Genet* **20**, 393–398 (2004).

46. Kaguni, L. S. DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem* **73**, 293–320 (2004).

47. Falkenberg, M., Larsson, N.-G. & Gustafsson, C. M. Replication and Transcription of Human Mitochondrial DNA. *Annual Review of Biochemistry* **93**, 47–77 (2024).

48. Fusté, J. M. *et al.* Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Mol Cell* **37**, 67–78 (2010).

49. D'Souza, A. R. & Minczuk, M. Mitochondrial transcription and translation: overview. *Essays Biochem* **62**, 309–320 (2018).

50. Kummer, E. & Ban, N. Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **22**, 307–325 (2021).

51. Gorman, G. S. *et al.* Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease. *Ann Neurol* **77**, 753–759 (2015).

52. Koňaříková, E., Marković, A., Korandová, Z., Houštěk, J. & Mráček, T. Current progress in the therapeutic options for mitochondrial disorders. *Physiol Res* **69**, 967–994 (2020).

53. Russell, O. M., Gorman, G. S., Lightowlers, R. N. & Turnbull, D. M. Mitochondrial Diseases: Hope for the Future. *Cell* **181**, 168–188 (2020).

54. Mitochondrial Disorders | National Institute of Neurological Disorders and Stroke. https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/mitochondrial-disorders.

55. Hameed, S. & Tadi, P. Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers. in *StatPearls* (StatPearls Publishing, Treasure Island (FL), 2024).

56. Gomori, G. A rapid one-step trichrome stain. *Am J Clin Pathol* **20**, 661–664 (1950).

57. Rocatcher, A. *et al.* The top 10 most frequently involved genes in hereditary optic neuropathies in 2186 probands. *Brain* **146**, 455–460 (2023).

58. Lenaers, G. *et al.* Dominant optic atrophy. *Orphanet J Rare Dis* **7**, 46 (2012).

59. Lenaers, G. *et al.* Dominant optic atrophy: Culprit mitochondria in the optic nerve. *Prog Retin Eye Res* **83**, 100935 (2021).

60. Ali, A., Esmaeil, A. & Behbehani, R. Mitochondrial Chronic Progressive External Ophthalmoplegia. *Brain Sciences* **14**, 135 (2024).

61. Mitochondrial Chronic Progressive External Ophthalmoplegia. https://www.mdpi.com/2076-3425/14/2/135.

62. Hanisch, F. *et al.* SANDO syndrome in a cohort of 107 patients with CPEO and mitochondrial DNA deletions. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **86**, 630–634 (2015).

63. Rak, M. *et al.* Mitochondrial Cytochrome c Oxidase Deficiency. *Clin Sci (Lond)* **130**, 393–407 (2016).

64. Amati-Bonneau, P. *et al.* OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* **131**, 338–351 (2008).

65. Müller-Höcker, J. Cytochrome-c-oxidase deficient cardiomyocytes in the human heart--an age-related phenomenon. A histochemical ultracytochemical study. *The American Journal of Pathology* **134**, 1167 (1989).

66. Larsson, N.-G. Somatic Mitochondrial DNA Mutations in Mammalian Aging. *Annu. Rev. Biochem.* **79**, 683–706 (2010).

67. Vincent, A. E. *et al.* Subcellular origin of mitochondrial DNA deletions in human skeletal muscle. *Ann Neurol* **84**, 289–301 (2018).

68. Shoffner, J. M. *et al.* Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* **61**, 931–937 (1990).

69. Rossignol, R. *et al.* Mitochondrial threshold effects. *Biochem J* **370**, 751–762 (2003).

70. Suomalainen, A. & Isohanni, P. Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms. *Neuromuscul Disord* **20**, 429–437 (2010).

71. AlMenabawy, N. *et al.* Clinical and genetic spectrum of mitochondrial DNA depletion syndromes: A report of 6 cases with 4 novel variants. *Mitochondrion* **65**, 139–144 (2022).

72. Villavicencio, K. M., Ahmed, N., Harris, M. L. & Singh, K. K. Mitochondrial DNA-depleter mouse as a model to study human pigmentary skin disorders. *Pigment Cell Melanoma Res* **34**, 179–187 (2021).

73. Bris, C. *et al.* Pathologies liées à des mutations de l'ADN mitochondrial. *Revue Francophone des Laboratoires* **2018**, 71–80 (2018).

74. Trifunovic, A. *et al.* Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**, 417–423 (2004).

75. Damas, J., Samuels, D. C., Carneiro, J., Amorim, A. & Pereira, F. Mitochondrial DNA Rearrangements in Health and Disease—A Comprehensive Study. *Human Mutation* **35**, 1–14 (2014).

76. Nissanka, N., Minczuk, M. & Moraes, C. T. Mechanisms of Mitochondrial DNA Deletion Formation. *Trends in Genetics* **35**, 235–244 (2019).

77. Bua, E. *et al.* Mitochondrial DNA-deletion mutations accumulate intracellularly to detrimental levels in aged human skeletal muscle fibers. *Am J Hum Genet* **79**, 469–480 (2006).

78. Khrapko, K. *et al.* Cell-by-cell scanning of whole mitochondrial genomes in aged human heart reveals a significant fraction of myocytes with clonally expanded deletions. *Nucleic Acids Res* **27**, 2434–2441 (1999).

79. Detection of a specific mitochondrial DNA deletion in tissues of older humans. - PMC. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC332752/.

80. Lujan, S. A. *et al.* Ultrasensitive deletion detection links mitochondrial DNA replication, disease, and aging. *Genome Biol* **21**, 248 (2020).

81. Tanhauser, S. M. & Laipis, P. J. Multiple deletions are detectable in mitochondrial DNA of aging mice. *J Biol Chem* **270**, 24769–24775 (1995).

82. Trifunov, S. *et al.* Clonal expansion of mtDNA deletions: different disease models assessed by digital droplet PCR in single muscle cells. *Sci Rep* **8**, 11682 (2018).

83. Inoue, K. *et al.* Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet* **26**, 176–181 (2000).

84. Tyynismaa, H. *et al.* Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 17687–17692 (2005).

85. Hudson, G., Deschauer, M., Busse, K., Zierz, S. & Chinnery, P. F. Sensory ataxic neuropathy due to a novel C10Orf2 mutation with probable germline mosaicism. *Neurology* **64**, 371–373 (2005).

86. Moraes, C. T. A helicase is born. *Nat Genet* **28**, 200–201 (2001).

87. Zinovkina, L. A. Mechanisms of Mitochondrial DNA Repair in Mammals. *Biochemistry Mosc.* **83**, 233–249 (2018).

88. Fernández-Millán, P. *et al.* The hexameric structure of the human mitochondrial replicative helicase Twinkle. *Nucleic Acids Research* **43**, 4284–4295 (2015).

89. Riccio, A. A. *et al.* Structural insight and characterization of human Twinkle helicase in mitochondrial disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **119**, e2207459119 (2022).

90. Goffart, S. *et al.* Twinkle mutations associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia lead to impaired helicase function and in vivo mtDNA replication stalling. *Hum Mol Genet* **18**, 328–340 (2009).

91. Spelbrink, J. N. *et al.* Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* **28**, 223–231 (2001).

92. Patel, G. *et al.* A257T Linker Region Mutant of T7 Helicase-Primase Protein Is Defective in DNA Loading and Rescued by T7 DNA Polymerase. *J Biol Chem* **286**, 20490–20499 (2011).

93. Wanrooij, S. *et al.* Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**, 11122–11127 (2008).

94. A, S. *et al.* Autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia with multiple deletions of mtDNA: clinical, biochemical, and molecular genetic features of the 10q-linked disease. *Neurology* **48**, (1997).

95. Nikali, K. *et al.* Infantile onset spinocerebellar ataxia is caused by recessive mutations in mitochondrial proteins Twinkle and Twinky. *Human Molecular Genetics* **14**, 2981–2990 (2005).

96. Druzhyna, N. M., Wilson, G. L. & LeDoux, S. P. Mitochondrial DNA repair in aging and disease. *Mech Ageing Dev* **129**, 383–390 (2008).

97. Clayton, D. A., Doda, J. N. & Friedberg, E. C. The absence of a pyrimidine dimer repair mechanism in mammalian mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **71**, 2777–2781 (1974).

98. Lee, T.-H. & Kang, T.-H. DNA Oxidation and Excision Repair Pathways. *Int J Mol Sci* **20**, 6092 (2019).

99. Kazak, L., Reyes, A. & Holt, I. J. Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 659–671 (2012).

100. Saki, M. & Prakash, A. DNA damage related crosstalk between the nucleus and mitochondria. *Free Radic Biol Med* **107**, 216–227 (2017).

101. Krokan, H. E. & Bjørås, M. Base excision repair. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a012583 (2013).

102. Rong, Z. *et al.* The Mitochondrial Response to DNA Damage. *Front. Cell Dev. Biol.* **9**, (2021).

103. Hegde, M. L., Hazra, T. K. & Mitra, S. Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res* **18**, 27–47 (2008).

104. Mason, P. A., Matheson, E. C., Hall, A. G. & Lightowlers, R. N. Mismatch repair activity in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Res* **31**, 1052–1058 (2003).

105. Lyabin, D. N., Eliseeva, I. A. & Ovchinnikov, L. P. YB-1 protein: functions and regulation. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **5**, 95–110 (2014).

106. Pohjoismäki, J. L. O. *et al.* Human heart mitochondrial DNA is organized in complex catenated networks containing abundant four-way junctions and replication forks. *J Biol Chem* **284**, 21446–21457 (2009).

107. Sage, J. M., Gildemeister, O. S. & Knight, K. L. Discovery of a novel function for human Rad51: maintenance of the mitochondrial genome. *J Biol Chem* **285**, 18984–18990 (2010).

108. Chen, W., Zhao, H. & Li, Y. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets. *Sig Transduct Target Ther* **8**, 1–25 (2023).

109. Youle, R. J. & van der Bliek, A. M. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* **337**, 1062–1065 (2012).

110. Sato, A. *et al.* Polymorphism, heteroplasmy, mitochondrial fusion and diabetes. *Biosci Rep* **23**, 313–337 (2003).

111. Liu, X., Weaver, D., Shirihai, O. & Hajnóczky, G. Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion–fission dynamics. *The EMBO Journal* **28**, 3074–3089 (2009).

112. Hales, K. G. & Fuller, M. T. Developmentally Regulated Mitochondrial Fusion Mediated by a Conserved, Novel, Predicted GTPase. *Cell* **90**, 121–129 (1997).

113. Koshiba, T. *et al.* Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* **305**, 858–862 (2004).

114. Cao, Y.-L. *et al.* MFN1 structures reveal nucleotide-triggered dimerization critical for mitochondrial fusion. *Nature* **542**, 372–376 (2017).

115. Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S. & Mihara, K. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem* **134**, 333–344 (2003).

116. Chen, H. *et al.* Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* **160**, 189–200 (2003).

117. Del Dotto, V., Fogazza, M., Carelli, V., Rugolo, M. & Zanna, C. Eight human OPA1 isoforms, long and short: What are they for? *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1859**, 263–269 (2018).

118. Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. & Mihara, K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* **25**, 2966–2977 (2006).

119. Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C. & Chan, D. C. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* **178**, 749–755 (2007).

120. Kaser, M., Kambacheld, M., Kisters-Woike, B. & Langer, T. Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease. *J Biol Chem* **278**, 46414–46423 (2003).

121. Anand, R. *et al.* The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *The Journal of Cell Biology* **204**, 919 (2014).

122. Tilokani, L., Nagashima, S., Paupe, V. & Prudent, J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem* **62**, 341–360 (2018).

123. Delettre, C. *et al.* Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* **26**, 207–210 (2000).

124. Olichon, A. *et al.* Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. *J Cell Physiol* **211**, 423–430 (2007).

125. Del Dotto, V. *et al.* OPA1 Isoforms in the Hierarchical Organization of Mitochondrial Functions. *Cell Rep* **19**, 2557–2571 (2017).

126. Elachouri, G. *et al.* OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Research* **21**, 12 (2011).

127. Giacomello, M., Pyakurel, A., Glytsou, C. & Scorrano, L. The cell biology of mitochondrial membrane dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **21**, 204–224 (2020).

128. Kraus, F., Roy, K., Pucadyil, T. J. & Ryan, M. T. Function and regulation of the divisome for mitochondrial fission. *Nature* **590**, 57–66 (2021).

129. Rosdah, A. A. *et al.* New perspectives on the role of Drp1 isoforms in regulating mitochondrial pathophysiology. *Pharmacol Ther* **213**, 107594 (2020).

130. Lhuissier, C. Pathologies de la dynamique mitochondriale : étude de la relation structure-fonction au cours de la fission mitochondriale. (Université d'Angers, 2022).

131. Lee, Y., Jeong, S.-Y., Karbowski, M., Smith, C. L. & Youle, R. J. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* **15**, 5001–5011 (2004).

132. Suzuki, M., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Youle, R. J. & Tjandra, N. The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J Mol Biol* **334**, 445–458 (2003).

133. Nolden, K. A., Harwig, M. C. & Hill, R. B. Human Fis1 directly interacts with Drp1 in an evolutionarily conserved manner to promote mitochondrial fission. *The Journal of Biological Chemistry* **299**, 105380 (2023).

134. Ihenacho, U. K., Meacham, K. A., Harwig, M. C., Widlansky, M. E. & Hill, R. B. Mitochondrial Fission Protein 1: Emerging Roles in Organellar Form and Function in Health and Disease. *Front Endocrinol (Lausanne)* **12**, 660095 (2021).

135. Otera, H. *et al.* Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* **191**, 1141 (2010).

136. Palmer, C. S. *et al.* MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* **12**, 565–573 (2011).

137. Osellame, L. D. *et al.* Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission. *J Cell Sci* **129**, 2170–2181 (2016).

138. Zhao, J. *et al.* Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J* **30**, 2762–2778 (2011).

139. Cho, B. *et al.* Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division. *Nat Commun* **8**, 15754 (2017).

140. Lewis, S. C., Uchiyama, L. F. & Nunnari, J. ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science* **353**, aaf5549 (2016).

141. Manor, U. *et al.* A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. *Elife* **4**, e08828 (2015).

142. Korobova, F., Gauvin, T. J. & Higgs, H. N. A role for myosin II in mammalian mitochondrial fission. *Curr Biol* **24**, 409–414 (2014).

143. Lee, J. E., Westrate, L. M., Wu, H., Page, C. & Voeltz, G. K. Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature* **540**, 139–143 (2016).

144. Deter, R. L. & De Duve, C. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. *J Cell Biol* **33**, 437–449 (1967).

145. Yin, X.-M., Ding, W.-X. & Gao, W. Autophagy in the liver. *Hepatology* **47**, 1773–1785 (2008).

146. Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. & Ohsumi, Y. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 458–467 (2009).

147. Klionsky, D. J. Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**, 931–937 (2007).

148. He, C. & Levine, B. The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol* **22**, 140–149 (2010).

149. Kuchitsu, Y. & Taguchi, T. Lysosomal microautophagy: an emerging dimension in mammalian autophagy. *Trends Cell Biol* **34**, 606–616 (2024).

150. Kaushik, S. & Cuervo, A. M. Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol* **22**, 407–417 (2012).

151. Klionsky, D. J. *et al.* Autophagy in major human diseases. *The EMBO Journal* **40**, e108863 (2021).

152. Zachari, M. & Ganley, I. G. The mammalian ULK1 complex and autophagy initiation. *Essays Biochem* **61**, 585–596 (2017).

153. Yamamoto, H. *et al.* The Intrinsically Disordered Protein Atg13 Mediates Supramolecular Assembly of Autophagy Initiation Complexes. *Dev Cell* **38**, 86–99 (2016).

154. Puri, C., Renna, M., Bento, C. F., Moreau, K. & Rubinsztein, D. C. ATG16L1 meets ATG9 in recycling endosomes: Additional roles for the plasma membrane and endocytosis in autophagosome biogenesis. *Autophagy* **10**, 182–184 (2014).

155. Yuan, J., Dong, X., Yap, J. & Hu, J. The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy. *J Hematol Oncol* **13**, 113 (2020).

156. Peng, Y., Wang, Y., Zhou, C., Mei, W. & Zeng, C. PI3K/Akt/mTOR Pathway and Its Role in Cancer Therapeutics: Are We Making Headway? *Front Oncol* **12**, 819128 (2022).

157. Astle, M. V. *et al.* AKT induces senescence in human cells via mTORC1 and p53 in the absence of DNA damage: implications for targeting mTOR during malignancy. *Oncogene* **31**, 1949–1962 (2012).

158. Carroll, B. *et al.* Persistent mTORC1 signaling in cell senescence results from defects in amino acid and growth factor sensing. *The Journal of Cell Biology* **216**, 1949 (2017).

159. Maarouf, A. *et al.* Anterior gradient protein 2 is a marker of tumor aggressiveness in breast cancer and favors chemotherapy-induced senescence escape. *Int J Oncol* **60**, 5 (2022).

160. Fimia, G. M. *et al.* Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* **447**, 1121–1125 (2007).

161. Levy, J. M. M., Towers, C. G. & Thorburn, A. Targeting autophagy in cancer. *Nat Rev Cancer* **17**, 528–542 (2017).

162. Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y. Role of the Apg12 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **35**, 553–561 (2003).

163. Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **36**, 2503–2518 (2004).

164. Nixon, R. A. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* **19**, 983–997 (2013).

165. Qiang, L., Li, H., Wang, Z., Wan, L. & Jiang, G. Deconvoluting the complexity of autophagy in colorectal cancer: From crucial pathways to targeted therapies. *Front. Oncol.* **12**, (2022).

166. Lemasters, J. J. Variants of mitochondrial autophagy: Types 1 and 2 mitophagy and micromitophagy (Type 3). *Redox Biol* **2**, 749–754 (2014).

167. Soubannier, V. *et al.* A Vesicular Transport Pathway Shuttles Cargo from Mitochondria to Lysosomes. *Current Biology* **22**, 135–141 (2012).

168. Soubannier, V., Rippstein, P., Kaufman, B. A., Shoubridge, E. A. & McBride, H. M. Reconstitution of Mitochondria Derived Vesicle Formation Demonstrates Selective Enrichment of Oxidized Cargo. *PLOS ONE* **7**, e52830 (2012).

169. Lei, Y. & Klionsky, D. J. New regulators of PRKN-independent mitophagy. *Autophagy* **18**, 1–3 (2022).

170. Sen, A. *et al.* Mitochondrial membrane proteins and VPS35 orchestrate selective removal of mtDNA. *Nat Commun* **13**, 6704 (2022).

171. Kakanj, P. *et al.* Lysosomal uptake of mtDNA mitigates heteroplasmy. 2024.02.16.580263 Preprint at https://doi.org/10.1101/2024.02.16.580263 (2024).

172. Lazo, S. *et al.* Mitochondrial DNA in extracellular vesicles declines with age. *Aging Cell* **20**, e13283 (2020).

173. Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F. & Youle, R. J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of Cell Biology* **183**, 795 (2008).

174. Valente, E. M. *et al.* Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science* **304**, 1158–1160 (2004).

175. Kitada, T. *et al.* Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature* **392**, 605–608 (1998).

176. Guo, M. Drosophila as a Model to Study Mitochondrial Dysfunction in Parkinson's Disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **2**, a009944 (2012).

177. Liu, S. & Lu, B. Reduction of Protein Translation and Activation of Autophagy Protect against PINK1 Pathogenesis in Drosophila melanogaster. *PLoS Genetics* **6**, e1001237 (2010).

178. Harper, J. W., Ordureau, A. & Heo, J.-M. Building and decoding ubiquitin chains for mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 93–108 (2018).

179. Wang, W. *et al.* Atomic structure of human TOM core complex. *Cell Discov* **6**, 67 (2020).

180. Hoshino, A. *et al.* The ADP/ATP translocase drives mitophagy independent of nucleotide exchange. *Nature* **575**, 375–379 (2019).

181. Rasool, S. *et al.* Mechanism of PINK1 activation by autophosphorylation and insights into assembly on the TOM complex. *Mol Cell* **82**, 44-59.e6 (2022).

182. Terradas, A. L. *et al.* Regulation of mitochondrial cargo-selective autophagy by posttranslational modifications. *The Journal of Biological Chemistry* **297**, 101339 (2021).

183. Zhang, C.-W., Hang, L., Yao, T.-P. & Lim, K.-L. Parkin Regulation and Neurodegenerative Disorders. *Frontiers in Aging Neuroscience* **7**, 248 (2016).

184. Tanaka, A. *et al.* Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* **191**, 1367–1380 (2010).

185. Birsa, N. *et al.* Lysine 27 Ubiquitination of the Mitochondrial Transport Protein Miro Is Dependent on Serine 65 of the Parkin Ubiquitin Ligase. *The Journal of Biological Chemistry* **289**, 14569 (2014).

186. Geisler, S. *et al.* PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat Cell Biol* **12**, 119–131 (2010).

187. Matsumoto, G., Wada, K., Okuno, M., Kurosawa, M. & Nukina, N. Serine 403 phosphorylation of p62/SQSTM1 regulates selective autophagic clearance of ubiquitinated proteins. *Mol Cell* **44**, 279–289 (2011).

188. Komatsu, M. *et al.* Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* **131**, 1149–1163 (2007).

189. Wang, S. *et al.* The mitophagy pathway and its implications in human diseases. *Sig Transduct Target Ther* **8**, 1–28 (2023).

190. Yun, J. *et al.* MUL1 acts in parallel to the PINK1/parkin pathway in regulating mitofusin and compensates for loss of PINK1/parkin. *Elife* **3**, e01958 (2014).

191. Igarashi, R. *et al.* Gemcitabine induces Parkin-independent mitophagy through mitochondrial-resident E3 ligase MUL1-mediated stabilization of PINK1. *Sci Rep* **10**, 1465 (2020).

192. Hanna, R. A. *et al.* Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) Interacts with Bnip3 Protein to Selectively Remove Endoplasmic Reticulum and Mitochondria via Autophagy. *The Journal of Biological Chemistry* **287**, 19094 (2012).

193. Poole, L. P., Bock-Hughes, A., Berardi, D. E. & Macleod, K. F. ULK1 promotes mitophagy via phosphorylation and stabilization of BNIP3. *Sci Rep* **11**, 20526 (2021).

194. Zhang, J. *et al.* Mitochondrial clearance is regulated by Atg7-dependent and -independent mechanisms during reticulocyte maturation. *Blood* **114**, 157 (2009).

195. Esteban-Martínez, L. *et al.* Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *EMBO J* **36**, 1688–1706 (2017).

196. Lv, M. *et al.* Structural insights into the recognition of phosphorylated FUNDC1 by LC3B in mitophagy. *Protein Cell* **8**, 25–38 (2017).

197. Chen, M. *et al.* Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy* **12**, 689–702 (2016).

198. Li, M., Jia, J., Zhang, X. & Dai, H. Selective binding of mitophagy receptor protein Bcl-rambo to LC3/GABARAP family proteins. *Biochem Biophys Res Commun* **530**, 292–300 (2020).

199. Van Humbeeck, C. *et al.* Parkin interacts with Ambra1 to induce mitophagy. *J Neurosci* **31**, 10249–10261 (2011).

200. Moyzis, A. G., Lally, N. S., Liang, W., Najor, R. H. & Gustafsson, Å. B. Mcl-1 Differentially Regulates Autophagy in Response to Changes in Energy Status and Mitochondrial Damage. *Cells* **11**, 1469 (2022).

201. Li, X.-X., Tsoi, B., Li, Y.-F., Kurihara, H. & He, R.-R. Cardiolipin and its different properties in mitophagy and apoptosis. *J Histochem Cytochem* **63**, 301–311 (2015).

202. Chu, C. T. *et al.* Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol* **15**, 1197–1205 (2013).

203. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (4th edition)1. *Autophagy* **17**, 1–382 (2021).

204. Bjørkøy, G. *et al.* p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol* **171**, 603–614 (2005).

205. McWilliams, T. G. *et al.* mito-QC illuminates mitophagy and mitochondrial architecture in vivo. *J Cell Biol* **214**, 333–345 (2016).

206. Katayama, H. *et al.* Visualizing and Modulating Mitophagy for Therapeutic Studies of Neurodegeneration. *Cell* **181**, 1176-1187.e16 (2020).

207. Plaza-Zabala, A., Sierra-Torre, V. & Sierra, A. Assessing Autophagy in Microglia: A Two-Step Model to Determine Autophagosome Formation, Degradation, and Net Turnover. *Frontiers in Immunology* **11**, 620602 (2021).

208. Franco-Iborra, S., Vila, M. & Perier, C. Mitochondrial Quality Control in Neurodegenerative Diseases: Focus on Parkinson's Disease and Huntington's Disease. *Front. Neurosci.* **12**, (2018).

209. Fang, E. F. *et al.* Mitophagy inhibits amyloid-β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* **22**, 401–412 (2019).

210. Kubli, D. A. *et al.* Parkin Protein Deficiency Exacerbates Cardiac Injury and Reduces Survival following Myocardial Infarction. *The Journal of Biological Chemistry* **288**, 915 (2012).

211. Pauly, M. *et al.* AMPK activation stimulates autophagy and ameliorates muscular dystrophy in the mdx mouse diaphragm. *Am J Pathol* **181**, 583–592 (2012).

212. Bravo-San Pedro, J. M., Kroemer, G. & Galluzzi, L. Autophagy and Mitophagy in Cardiovascular Disease. *Circ Res* **120**, 1812–1824 (2017).

213. Masiero, E. & Sandri, M. Autophagy inhibition induces atrophy and myopathy in adult skeletal muscles. *Autophagy* **6**, 307–309 (2010).

214. Glick, D., Barth, S. & Macleod, K. F. Autophagy: cellular and molecular mechanisms. *The Journal of pathology* **221**, 3 (2010).

215. OMS. https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/ageing-and-health. (2021).

216. Dattani, S., Rodés-Guirao, L., Ritchie, H., Ortiz-Ospina, E. & Roser, M. Life Expectancy. *Our World in Data* (2023).

217. A Timeline of Contraception | American Experience | PBS. https://www.pbs.org/wgbh/americanexperience/features/pill-timeline/.

218. Mapping the massive global fertility decline over the last 20 years - Population and Societies - Ined Editions. *Ined - Institut national d'études démographiques* https://www.ined.fr/en/publications/editions/population-and-societies/mapping-the-massive-global-fertility-decline-over-the-last-20-years/.

219. Nargund, G. Declining birth rate in Developed Countries: A radical policy re-think is required. *Facts Views Vis Obgyn* **1**, 191–193 (2009).

220. Jacobzone, S. & Oxley, H. Ageing and Health Care Costs.

221. Northrop, J. H. THE INFLUENCE OF THE INTENSITY OF LIGHT ON THE RATE OF GROWTH AND DURATION OF LIFE OF DROSOPHILA. *Journal of General Physiology* **9**, 81–86 (1925).

222. McCay, C. M., Maynard, L. A., Sperling, G. & Barnes, L. L. Retarded Growth, Life Span, Ultimate Body Size and Age Changes in the Albino Rat after Feeding Diets Restricted in Calories. *Nutrition Reviews* **33**, 241–243 (1975).

223. Falls and Fractures in Older Adults: Causes and Prevention. *National Institute on Aging* https://www.nia.nih.gov/health/falls-and-falls-prevention/falls-and-fractures-older-adults-causes-and-prevention (2022).

224. Trifunovic, A. & Larsson, N.-G. Mitochondrial dysfunction as a cause of ageing. *J Intern Med* **263**, 167–178 (2008).

225. Brys, K., Vanfleteren, J. R. & Braeckman, B. P. Testing the rate-of-living/oxidative damage theory of aging in the nematode model Caenorhabditis elegans. *Exp Gerontol* **42**, 845–851 (2007).

226. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. The Hallmarks of Aging. *Cell* **153**, 1194–1217 (2013).

227. López-Otín, C., Blasco, M. A., Partridge, L., Serrano, M. & Kroemer, G. Hallmarks of aging: An expanding universe. *Cell* **186**, 243–278 (2023).

228. López-Otín, C. & Kroemer, G. Hallmarks of Health. *Cell* **184**, 33–63 (2021).

229. Amorim, J. A. *et al.* Mitochondrial and metabolic dysfunction in ageing and age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol* **18**, 243–258 (2022).

230. Wang, J. *et al.* Dilated cardiomyopathy and atrioventricular conduction blocks induced by heart-specific inactivation of mitochondrial DNA gene expression. *Nat Genet* **21**, 133–137 (1999).

231. Wredenberg, A. *et al.* Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 15066–15071 (2002).

232. Park, C. B. *et al.* MTERF3 is a negative regulator of mammalian mtDNA transcription. *Cell* **130**, 273–285 (2007).

233. Metodiev, M. D. *et al.* Methylation of 12S rRNA Is Necessary for In Vivo Stability of the Small Subunit of the Mammalian Mitochondrial Ribosome. *Cell Metabolism* **9**, 386–397 (2009).

234. Sun, N. *et al.* Measuring in vivo mitophagy. *Molecular cell* **60**, 685 (2015).

235. García-Prat, L. *et al.* Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature* **529**, 37–42 (2016).

236. Drummond, M. J. *et al.* Downregulation of E3 Ubiquitin Ligases and Mitophagy-Related Genes in Skeletal Muscle of Physically Inactive, Frail Older Women: A Cross-Sectional Comparison. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences* **69**, 1040 (2014).

237. Rana, A. *et al.* Promoting Drp1-mediated mitochondrial fission in midlife prolongs healthy lifespan of Drosophila melanogaster. *Nat Commun* **8**, 448 (2017).

238. Aparicio, R., Rana, A. & Walker, D. W. Upregulation of the Autophagy Adaptor p62/SQSTM1 Prolongs Health and Lifespan in Middle-Aged Drosophila. *Cell reports* **28**, 1029 (2019).

239. Rana, A., Rera, M. & Walker, D. W. Parkin overexpression during aging reduces proteotoxicity, alters mitochondrial dynamics, and extends lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, 8638–8643 (2013).

240. Palikaras, K., Lionaki, E. & Tavernarakis, N. Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in C. elegans. *Nature* **521**, 525–528 (2015).

241. Park, C. B. & Larsson, N.-G. Mitochondrial DNA mutations in disease and aging. *The Journal of Cell Biology* **193**, 809 (2011).

242. Wallace, D. C. A mitochondrial paradigm for degenerative diseases and ageing. *Novartis Found Symp* **235**, 247–263; discussion 263-266 (2001).

243. Edgar, D. *et al.* Random point mutations with major effects on protein-coding genes are the driving force behind premature aging in mtDNA mutator mice. *Cell Metab* **10**, 131–138 (2009).

244. Trifunovic, A. *et al.* Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* **429**, 417–423 (2004).

245. Sprason, C., Tucker, T. & Clancy, D. MtDNA deletions and aging. *Frontiers in Aging* **5**, 1359638 (2024).

246. Lai, L.-P. *et al.* Atrial fibrillation is associated with accumulation of aging-related common type mitochondrial DNA deletion mutation in human atrial tissue. *Chest* **123**, 539–544 (2003).

247. Liang, P., Hughes, V. & Fukagawa, N. K. Increased prevalence of mitochondrial DNA deletions in skeletal muscle of older individuals with impaired glucose tolerance: possible marker of glycemic stress. *Diabetes* **46**, 920–923 (1997).

248. Williams, S. L., Mash, D. C., Züchner, S. & Moraes, C. T. Somatic mtDNA mutation spectra in the aging human putamen. *PLoS Genet* **9**, e1003990 (2013).

249. Vecoli, C., Borghini, A. & Andreassi, M. G. The molecular biomarkers of vascular aging and atherosclerosis: telomere length and mitochondrial DNA4977 common deletion. *Mutat Res Rev Mutat Res* **784**, 108309 (2020).

250. Jacobson, M. D. *et al.* Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* **361**, 365–369 (1993).

251. Wang, J., Silva, J. P., Gustafsson, C. M., Rustin, P. & Larsson, N. G. Increased in vivo apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 4038–4043 (2001).

252. Sörensen, L. *et al.* Late-Onset Corticohippocampal Neurodepletion Attributable to Catastrophic Failure of Oxidative Phosphorylation in MILON Mice. *The Journal of Neuroscience* **21**, 8082 (2001).

253. Ekstrand, M. I. *et al.* Progressive parkinsonism in mice with respiratory-chain-deficient dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 1325 (2007).

254. Silva, J. P. *et al.* Impaired insulin secretion and beta-cell loss in tissue-specific knockout mice with mitochondrial diabetes. *Nat Genet* **26**, 336–340 (2000).

255. Niu, X., Trifunovic, A., Larsson, N.-G. & Canlon, B. Somatic mtDNA mutations cause progressive hearing loss in the mouse. *Exp Cell Res* **313**, 3924–3934 (2007).

256. Kujoth, G. C. *et al.* Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging. *Science* **309**, 481–484 (2005).

257. Weiland, D. *et al.* Imbalance of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes in the Epidermis Induces Severe Skin Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology* **138**, 132–140 (2018).

258. Litviňuková, M. *et al.* Cells of the adult human heart. *Nature* **588**, 466–472 (2020).

259. DiFrancesco, D. & Borer, J. S. The funny current: cellular basis for the control of heart rate. *Drugs* **67 Suppl 2**, 15–24 (2007).

260. Anderson, R. H., Yanni, J., Boyett, M. R., Chandler, N. J. & Dobrzynski, H. The anatomy of the cardiac conduction system. *Clin Anat* **22**, 99–113 (2009).

261. Saridena, A., Saridena, A. & Kethar, J. Machine Learning for Risk Prediction of Cardiovascular Disease: Current Advances and Future Prospects. *Journal of Student Research* **12**, (2023).

262. Fajemiroye, J. O. *et al.* Aging-Induced Biological Changes and Cardiovascular Diseases. *BioMed Research International* **2018**, e7156435 (2018).

263. Franceschi, C., Garagnani, P., Parini, P., Giuliani, C. & Santoro, A. Inflammaging: a new immune–metabolic viewpoint for age-related diseases. *Nat Rev Endocrinol* **14**, 576–590 (2018).

264. Kakimoto, Y. *et al.* Myocardial lipofuscin accumulation in ageing and sudden cardiac death. *Sci Rep* **9**, 3304 (2019).

265. Tresch, D. D. & Thakur, R. K. VENTRICULAR ARRHYTHMIAS IN THE ELDERLY. *Emergency Medicine Clinics of North America* **16**, 627–648 (1998).

266. Lok, N. S. & Lau, C. P. Prevalence of palpitations, cardiac arrhythmias and their associated risk factors in ambulant elderly. *Int. J. Cardiol.* **54**, 231–236 (1996).

267. Hatch, F., Lancaster, M. K. & Jones, S. A. Aging is a primary risk factor for cardiac arrhythmias: disruption of intracellular Ca2+ regulation as a key suspect. *Expert Review of Cardiovascular Therapy* **9**, 1059–1067 (2011).

268. Müller-Höcker, J. Cytochrome-c-oxidase deficient cardiomyocytes in the human heart--an age-related phenomenon. A histochemical ultracytochemical study. *Am J Pathol* **134**, 1167–1173 (1989).

269. Baris, O. R. *et al.* Mosaic Deficiency in Mitochondrial Oxidative Metabolism Promotes Cardiac Arrhythmia during Aging. *Cell Metab* **21**, 667–677 (2015).

270. Hudson, G. *et al.* 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**, 329–337 (2008).

271. Rouzier, C. *et al.* The MFN2 gene is responsible for mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotype. *Brain* **135**, 23–34 (2012).

272. Chen, H. *et al.* Mitochondrial Fusion Is Required for mtDNA Stability in Skeletal Muscle and Tolerance of mtDNA Mutations. *Cell* **141**, 280–289 (2010).

273. Malena, A., Loro, E., Di Re, M., Holt, I. J. & Vergani, L. Inhibition of mitochondrial fission favours mutant over wild-type mitochondrial DNA. *Human Molecular Genetics* **18**, 3407–3416 (2009).

274. Kurihara, Y. *et al.* Mitophagy plays an essential role in reducing mitochondrial production of reactive oxygen species and mutation of mitochondrial DNA by

maintaining mitochondrial quantity and quality in yeast. *J Biol Chem* **287**, 3265–3272 (2012).

275. Dai, Y. *et al.* Rapamycin drives selection against a pathogenic heteroplasmic mitochondrial DNA mutation. *Hum Mol Genet* **23**, 637–647 (2014).

276. Sarzi, E. *et al.* The human OPA1delTTAG mutation induces premature age-related systemic neurodegeneration in mouse. *Brain* **135**, 3599–3613 (2012).

277. Wakabayashi, J. *et al.* The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J Cell Biol* **186**, 805–816 (2009).

278. Wang, D. *et al.* A small molecule promotes mitochondrial fusion in mammalian cells. *Angew Chem Int Ed Engl* **51**, 9302–9305 (2012).

279. Doyle, B. & Griffiths, L. A. The metabolism of ellagic acid in the rat. *Xenobiotica* **10**, 247–256 (1980).

280. Ryu, D. *et al.* Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in C. elegans and increases muscle function in rodents. *Nat Med* **22**, 879–888 (2016).

281. Singh, A. *et al.* Urolithin A improves muscle strength, exercise performance, and biomarkers of mitochondrial health in a randomized trial in middle-aged adults. *Cell Rep Med* **3**, 100633 (2022).

282. D'Amico, D. *et al.* Impact of the Natural Compound Urolithin A on Health, Disease, and Aging. *Trends in Molecular Medicine* **27**, 687–699 (2021).

283. Srivastava, V. & Gross, E. Mitophagy-promoting agents and their ability to promote healthy-aging. *Biochem Soc Trans* **51**, 1811–1846 (2023).

284. Sciacco, M. & Bonilla, E. [43]Cytochemistry and immunocytochemistry of mitochondria in tissue sections. in *Methods in Enzymology* vol. 264 509–521 (Elsevier, 1996).

285. The Principles of Humane Experimental Technique - 1960 - Medical Journal of Australia - Wiley Online Library. https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.5694/j.1326-5377.1960.tb73127.x.

286. Brüning, J. C. *et al.* A Muscle-Specific Insulin Receptor Knockout Exhibits Features of the Metabolic Syndrome of NIDDM without Altering Glucose Tolerance. *Molecular Cell* **2**, 559–569 (1998).

287. Iwata, R., Casimir, P. & Vanderhaeghen, P. Mitochondrial dynamics in postmitotic cells regulate neurogenesis. *Science* **369**, 858–862 (2020).

288. Budi, Y. P. *et al.* The injections of mitochondrial fusion promoter M1 during proestrus disrupt the progesterone secretion and the estrous cycle in the mouse. *Sci Rep* **13**, 2392 (2023).

289. Goudenège, D. *et al.* eKLIPse: a sensitive tool for the detection and quantification of mitochondrial DNA deletions from next-generation sequencing data. *Genet Med* **21**, 1407–1416 (2019).

290. Phillips, N. R., Sprouse, M. L. & Roby, R. K. Simultaneous quantification of mitochondrial DNA copy number and deletion ratio: A multiplex real-time PCR assay. *Sci Rep* **4**, 3887 (2014).

291. Ding, M. *et al.* Mitochondrial fusion promoter restores mitochondrial dynamics balance and ameliorates diabetic cardiomyopathy in an optic atrophy 1-dependent way. *Acta Physiol (Oxf)* **229**, e13428 (2020).

292. Au, N. P. B. *et al.* A small molecule M1 promotes optic nerve regeneration to restore target-specific neural activity and visual function. *Proc Natl Acad Sci U S A* **119**, e2121273119 (2022).

293. Ryu, D. *et al.* Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in C. elegans and increases muscle function in rodents. *Nat Med* **22**, 879–888 (2016).

294. Sagar, S. & Gustafsson, A. B. Cardiovascular aging: the mitochondrial influence. *The journal of cardiovascular aging* **3**, 33 (2023).

295. Kjer, P. Infantile optic atrophy with dominant mode of inheritance: a clinical and genetic study of 19 Danish families. *Acta Ophthalmol Suppl* **164**, 1–147 (1959).

296. Hübner, G., Gokel, J. M., Pongratz, D., Johannes, A. & Park, J.-W. Fatal mitochondrial cardiomyopathy in Kearns-Sayre Syndrome. *Vichows Archiv A Pathol Anat* **408**, 611–621 (1986).

297. Larsson, N.-G. Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu Rev Biochem* **79**, 683–706 (2010).

298. Sciacco, M. & Bonilla, E. Cytochemistry and immunocytochemistry of mitochondria in tissue sections. *Methods Enzymol* **264**, 509–521 (1996).

299. Monteiro, L. de B., Davanzo, G. G., de Aguiar, C. F. & Moraes-Vieira, P. M. M. Using flow cytometry for mitochondrial assays. *MethodsX* **7**, 100938 (2020).

300. Jung, T. *et al.* Automated determination of 8-OHdG in cells and tissue via immunofluorescence using a specially created antibody. *Biotechnology Reports* **42**, e00833 (2024).

301. Xie, X. & Zhu, X. Visualization of mtDNA Using FISH. *Methods Mol Biol* **2615**, 89–98 (2023).

302. Amartuvshin, O. *et al.* Aging shifts mitochondrial dynamics toward fission to promote germline stem cell loss. *Aging Cell* **19**, e13191 (2020).

303. Wu, N. N., Zhang, Y. & Ren, J. Mitophagy, Mitochondrial Dynamics, and Homeostasis in Cardiovascular Aging. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2019**, (2019).

304. Lima, T., Li, T. Y., Mottis, A. & Auwerx, J. Pleiotropic effects of mitochondria in aging. *Nat Aging* **2**, 199–213 (2022).

305. Kimoloi, S. *et al.* Combined fibre atrophy and decreased muscle regeneration capacity driven by mitochondrial DNA alterations underlie the development of sarcopenia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **13**, 2132–2145 (2022).

306. Basu, S. *et al.* Accurate mapping of mitochondrial DNA deletions and duplications using deep sequencing. *PLoS Genetics* **16**, e1009242 (2020).

307. Dölle, C., Bindoff, L. A. & Tzoulis, C. 3,3'-Diaminobenzidine staining interferes with PCR-based DNA analysis. *Sci Rep* **8**, 1272 (2018).

308. Simard, M.-L., Mourier, A., Greaves, L. C., Taylor, R. W. & Stewart, J. B. A novel histochemistry assay to assess and quantify focal cytochrome c oxidase deficiency. *The Journal of Pathology* **245**, 311 (2018).

309. Zeng, J. *et al.* Restoration of lysosomal acidification rescues autophagy and metabolic dysfunction in non-alcoholic fatty liver disease. *Nat Commun* **14**, 2573 (2023).

310. Monet, W. *et al.* Glycolysis in senescence. (2023).

311. Purves, D. *et al.* Anatomy of the Eye. in *Neuroscience. 2nd edition* (Sinauer Associates, 2001).

312. Quigley, H. A. & Broman, A. T. The number of people with glaucoma worldwide in 2010 and 2020. *Br J Ophthalmol* **90**, 262–267 (2006).

313. Curcio, C. A. & Allen, K. A. Topography of ganglion cells in human retina. *J Comp Neurol* **300**, 5–25 (1990).

314. Friedman, D. S. *et al.* Prevalence of age-related macular degeneration in the United States. *Arch Ophthalmol* **122**, 564–572 (2004).

315. Delettre, C., Lenaers, G., Pelloquin, L., Belenguer, P. & Hamel, C. P. OPA1 (Kjer type) dominant optic atrophy: a novel mitochondrial disease. *Mol Genet Metab* **75**, 97–107 (2002).

316. Amati-Bonneau, P. *et al.* OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* **41**, 1855–1865 (2009).

317. Chen, Y. *et al.* Mitochondrial aconitase controls adipogenesis through mediation of cellular ATP production. *FASEB J* **34**, 6688–6702 (2020).

318. Zatyka, M. *et al.* Depletion of WFS1 compromises mitochondrial function in hiPSC-derived neuronal models of Wolfram syndrome. *Stem Cell Reports* **18**, 1090–1106 (2023).

319. Yu-Wai-Man, P. *et al.* The prevalence and natural history of dominant optic atrophy due to OPA1 mutations. *Ophthalmology* **117**, 1538–1546, 1546.e1 (2010).

320. Thiselton, D. L. *et al.* A comprehensive survey of mutations in the OPA1 gene in patients with autosomal dominant optic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **43**, 1715–1724 (2002).

321. Batten, B. A family suffering from hereditary optic atrophy. *Trans Ophthalmol Soc UK* (1896).

322. Snell, S. Disease of the optic nerve I. hereditary or congenital optic atrophy and allied cases. *Trans Ophthalmol Soc UK* (1897).

323. Carelli, V. *et al.* Mitochondrial optic neuropathies: how two genomes may kill the same cell type? *Biosci Rep* **27**, 173–184 (2007).

324. Milea, D., Amati-Bonneau, P., Reynier, P. & Bonneau, D. Genetically determined optic neuropathies. *Curr Opin Neurol* **23**, 24–28 (2010).

325. Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P. G., Hudson, G. & Chinnery, P. F. Inherited mitochondrial optic neuropathies. *J Med Genet* **46**, 145–158 (2009).

326. Votruba, M. *et al.* Clinical features in affected individuals from 21 pedigrees with dominant optic atrophy. *Arch Ophthalmol* **116**, 351–358 (1998).

327. Puomila, A. *et al.* Dominant optic atrophy: correlation between clinical and molecular genetic studies. *Acta Ophthalmol Scand* **83**, 337–346 (2005).

328. Majander, A. *et al.* The Pattern of Retinal Ganglion Cell Loss in OPA1-Related Autosomal Dominant Optic Atrophy Inferred From Temporal, Spatial, and Chromatic Sensitivity Losses. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **58**, 502–516 (2017).

329. Hudson, G. *et al.* 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**, 329–337 (2008).

330. Ruiz-Pesini, E. *et al.* An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res* **35**, D823-828 (2007).

331. Neuhaus, J. F. G. *et al.* Catecholamine metabolism drives generation of mitochondrial DNA deletions in dopaminergic neurons. *Brain* **137**, 354–365 (2014).

332. Peter, B. & Falkenberg, M. TWINKLE and Other Human Mitochondrial DNA Helicases: Structure, Function and Disease. *Genes (Basel)* **11**, (2020).

333. Gilkerson, R. *et al.* The Mitochondrial Nucleoid: Integrating Mitochondrial DNA into Cellular Homeostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**, a011080 (2013).

334. Ylikallio, E., Tyynismaa, H., Tsutsui, H., Ide, T. & Suomalainen, A. High mitochondrial DNA copy number has detrimental effects in mice. *Hum Mol Genet* **19**, 2695–2705 (2010).

335. Kimoloi, S. *et al.* Combined fibre atrophy and decreased muscle regeneration capacity driven by mitochondrial DNA alterations underlie the development of sarcopenia. *J Cachexia Sarcopenia Muscle* **13**, 2132–2145 (2022).

Table des matières

I. AVERTISSEMENT 1

II. ENGAGEMENT DE NON-PLAGIAT 2

III. REMERCIEMENTS 4

IV. ABREVIATIONS 6

I. SOMMAIRE 9

1. INTRODUCTION 11

1.1. Préambule *11*

1.2. Les mitochondries *12*

1.2.1. Définition, origine, importance 12

1.2.2. Structure 13

1.2.3. Répartition 15

1.2.4. Biogenèse 16

1.2.5. Fonction 18

1.2.5.1. Glycolyse 18

1.2.5.2. β-Oxydation des acides gras 20

1.2.5.3. Cycle de Krebs 22

1.2.5.4. Phosphorylation Oxydative 22

1.3. L'ADN mitochondrial *25*

1.3.1. Organisation 25

1.3.2. Les Direct Repeats (DR) 27

1.3.3. Réplication 28

1.3.4. Transcription 30

1.3.5. Traduction 31

1.4. Pathologies mitochondriales *31*

1.4.1. Contexte biologique et sociétal 31

1.4.2. Exemples 32

1.4.3. COX-déficience 35

1.4.4. Mutations de l'ADNmt 37

1.4.4.1. Hétéroplasmie 37

1.4.4.2. Déplétion de l'ADNmt 37

1.4.4.3. Mutations ponctuelles 38

1.4.4.4. Duplications 39

1.4.4.5. Délétions 39

1.5. Twinkle *42*

1.5.1. Structure 42

1.5.2. Pathologies associées aux mutations de *TWNK* 44

1.6. Les contrôles-qualité de l'ADN mitochondrial *47*

1.6.1. Systèmes de réparation moléculaire 47
1.6.1.1. Réparation par excision de bases (BER) 47
1.6.1.2. Réparation des mésappariements (MisMatch repair) MMR 48
1.6.1.3. Réparation des cassures double brin (DSBR) 48
1.6.2. La dynamique mitochondriale 48
1.6.2.1. Généralités 48
1.6.2.2. La fusion mitochondriale 49
1.5.2.3. La fission mitochondriale 55
1.5.2.4. Pathologies associées 60
1.5.3. Mitophagie 62
1.5.3.1. Autophagie 62
1.5.3.2. Les trois types de mitophagie 66
1.5.3.3. La mitophagie Parkin-dépendante 69
1.5.3.4. La mitophagie Parkin-indépendante 72
1.5.3.4. Le flux mitophagique 75
1.5.3.6. Pathologies associées 77
1.6. Le vieillissement 79
1.6.2. La place du vieillissement dans la société moderne 79
1.6.3. Pathologies associées au vieillissement 81
1.6.4. Les théories du vieillissement 81
1.6.5. Les origines du vieillissement 83
1.6.5.3. Une grande diversité de phénomène 83
1.6.5.4. Vieillissement mitochondrial 85
1.7. Le cœur 88
1.7.1. Structure et fonction 88
1.7.2. Maladies CardioVasculaires (MCV) 90
1.7.3. Le vieillissement cardiaque 91
1.8. Implication des mitochondries dans le vieillissement pathologique cardiaque 93
1.9. Objectifs du doctorat 112
1.9.1. Contexte 112
1.9.2. Résultats antérieurs à l'étude : Modèle K320E-Twinkle^{Myo} 112
1.9.3. Hypothèse et approche expérimentale 114
1.9.4. Modulation génétique de la dynamique mitochondriale 115
1.9.5. Stimulation pharmacologique de la fusion 115
1.9.6. Stimulation pharmacologique de la mitophagie 116
1.9.7. Analyse des étapes du vieillissement pathologique cardiaque 116
2. MATERIEL & METHODES 119
2.1. Modèles murins 119
2.1.1. Gestion des animaux 119
2.1.2. Souris K320E-Twinkle^{Myo} 119
2.1.3. *Souris Drp1$^{+/-}$* 121
2.1.4. *Souris Opa1^{delTTAG}* 121

2.1.5. Croisements K320E-Twinkle^{myo} X *Drp1*$^{+/-}$ & K320E-Twinkle^{myo} X *Opa1*^{delTTAG} 121
2.2. Traitements pharmacologiques des souris 124
2.2.1. Fusion promoter M1 124
2.2.2. Urolithine A 124
2.3. Traitement du tissu cardiaque 125
2.4. ADN 126
2.4.1. Extraction 126
2.4.2. PCR 126
2.4.2.1. Amorces 126
2.4.2.2. PCR simple & migration sur gel 126
2.4.2.3. qPCR 128
2.4.2.4. Séquençage de l'ADNmt (NGS) 129
2.5. Protéines 133
2.5.1. Anticorps 133
2.5.2. Extraction et purification des protéines 135
2.5.3. Analyses protéiques semi-quantitatives 135
2.5.3.1. Dosage 135
2.5.3.2. Simple Western® 135
2.5.3.3. Western Blotting 136
2.5.4. Immunomarquages 136
2.6. Histochimie 137
2.6.1. Coloration à l'hématoxyline 137
2.6.2. Double coloration enzymatique COX/SDH 137
2.7. Imagerie 138
2.7.1. Acquisitions 138
2.7.1.1. Leica Slide Scanner 138
2.7.1.2. Microscopie électronique à transmission 138
2.7.1.3. Microscopie Confocale 139
2.7.2. Comptage des cardiomyocytes COX-déficients 139
2.7.3. Traitements des images obtenues au microscope confocal 141
2.8. Télémétrie 143
2.8.1. Installation des puces de télémétrie 143
2.8.2. Enregistrement des ECGs 143
2.9. Statistiques & réalisations graphiques 144
3. RESULTATS 146
3.1. La fusion mitochondriale médiée par OPA1 protège les muscles cardiaque et squelettique de la COX-déficience mais pas de l'accumulation de délétions de l'ADNmt chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} 146
3.1.1. Validation des modèles 146
3.1.1.1. Vérification du génotype des animaux inclus dans l'étude 146
3.1.1.2. Validation des modèles *Drp1*$^{+/-}$ et *Opa1*^{delTTAG} 146

3.1.1.3. Les souris des 6 génotypes utilisés ne présentent pas de différence de poids corporel, ni d'hypertrophie cardiaque à 18 et 24 mois....148
3.1.2. La dynamique mitochondriale ne module pas la quantité d'ADNmt ou de délétions dans le cœur et les muscles de K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois....150
3.1.3. L'haploinsuffisance en protéine OPA1 entraîne une accumulation accrue de cardiomyocytes et myocytes COX-déficients chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois....153
3.1.4. Impact de l'haploinsuffisance en protéine OPA1 sur les arythmies cardiaques des souris K320E-Twinkle^{Myo} 155
3.2. Stimulation de la fusion mitochondriale par IP journalière de M1 fusion promoter 157
3.2.1. Effet du traitement au M1 fusion promoter sur le poids des animaux traités....157
3.2.2. Le M1 fusion promoter stimule la production d'OPA1, sans impacter les proportions de formes courtes et longues 159
3.2.3. Le traitement au M1 n'influence pas le taux de délétions des copies de l'ADNmt dans le cœur et les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois 161
3.2.4. Le M1 fusion promoter n'influence pas le taux de cardiomyocytes COX^{-} dans le cœur de la souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois 163
3.3. L'autophagie est plus forte dans le cœur des souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois mais s'agit-il de mitophagie ? 164
3.4. Le traitement à l'Urolithine A (UA) 168
3.4.1. Le traitement à l'urolithine A n'a pas d'effet significatif sur le poids des animaux traités 168
3.4.2. Impact de l'Urolithine A sur l'activité autophagique dans le cœur des souris contrôles et K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois....170
3.4.3. L'UA n'influence pas le taux de délétions des copies de l'ADNmt dans le cœur ou les muscles squelettiques chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois 170
3.4.4. L'UA n'a pas d'effet significatif sur la COX-déficience dans le cœur et les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois et les réduits à 24 mois....173
4. CONCLUSION-DISCUSSION 174
4.1. Remise en contexte 174
4.2. La fusion mitochondriale à un rôle protecteur lors du vieillissement cardiaque et musculaire . 175
4.3. La stimulation de la fusion mitochondriale par le M1 fusion promoter n'a pas amélioré le phénotype cardiaque des souris K320E-Twinkle^{Myo} à la dose testée.... 176
4.4. La souris K320E-TwinkleMyo présente une mitophagie exacerbée 177
4.5. La stimulation de la mitophagie par l'UA n'est pas suffisante pour améliorer le phénotype cardiaque des souris K320E-Twinkle^{Myo} à la dose testée 177
5. PERSPECTIVES 178
5.1. Limitations de l'étude 178
5.2. Modèle K320E-Twinkle^{Myo}-Opa1^{delTTAG} 179
5.3. Traitement au M1.... 179
5.4. Mitophagie chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} 180
5.5. Traitement UA 181

5.6. Sénescence *181*
6. PROJET ANNEXE : Y506C, NOUVEAU VARIANT DE *TWNK* IMPLIQUE DANS L'ATROPHIE OPTIQUE DOMINANTE (AOD) ? 182
6.1 Introduction *182*
6.1.1. L'œil 182
6.1.2. L'AOD 185
6.1.2.1. Référencement 185
6.1.2.2. Définition 185
6.1.2.3. Épidémiologie 185
6.1.2.4. Description clinique 186
6.1.3. Contexte de l'étude annexe 188
6.1.4. Objectif de l'étude annexe 190
6.1.4.1. Impact de la transfection de plasmides d'expression des 3 variants sur le réseau et l'ADN mitochondriaux de la lignée UACC-62 190
6.1.4.2. Impact du variant Y506C sur le réseau et l'ADN mitochondriaux du patient et de son père 191
6.2. Matériel et Méthode *191*
6.2.1. L'identification de variants potentiellement pathogènes de *TWNK*. 191
6.2.2. Transfection transitoire de variants de *TWNK* dans des cellules UACC-62 192
6.2.2.1. Mutagenèse dirigée de *TWNK* 192
6.2.2.2. Transformation bactérienne et amplification des séquences mutantes 192
6.2.2.3. Clonage des séquences *TWNK* mutantes dans pIRES2-eGFP 193
6.2.3. Culture cellulaire 194
6.2.3.1. UACC-62 194
6.2.3.1. Fibroblastes 194
6.2.4. Traitement des cellules 195
6.2.4.1. Transfection 195
6.2.4.2. Marquages live en chambres Ibidi® 196
6.2.4.3. Tri cellulaire 196
6.2.4.4. Déplétion de l'ADNmt au BET 197
6.2.5. ADN 197
6.2.5.1. Amorces 197
6.2.5.2. Nested PCR 198
6.3. Résultats Préliminaires *200*
6.3.1. Analyse de l'impact de la mutation Y506C de TWINKLE sur l'ADNmt et le réseau mitochondrial 200
6.3.1.1. Etude des variants de TWINKLE identifiés sur modèle cellulaire UACC-62 200
6.3.1.2. Etude sur les fibroblastes porteurs du variant Y506C-Twinkle (le patient et son père) 201
6.3.1.3. Analyse du réseau mitochondrial chez les fibroblastes contrôle et sujets porteurs de la mutation Y506C-TWINKLE 207
6.4. Discussion *207*
6.4.1. UACC-62 207
6.4.2. Fibroblastes 208

6.5. Conclusions-Perspectives *209*
7. ANNEXES 209
7.1. Colorations COX/SDH dans les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo}, Drp1$^{+/-}$, Opa1^{delTTAG} et doubles mutants de 18 mois *209*
7.2. Observation de regroupement de mitochondries sous-sarcolemmales chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois *211*
7.3. Observation de fibres musculaires atrophiées, présentant une déficience mitochondriale et en voie de régénération chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois *213*
BIBLIOGRAPHIE 215
TABLE DES MATIERES 246
TABLE DES FIGURES 251
TABLE DES TABLEAUX 256

Table des figures

Figure 1 : Image de mitochondries cardiaques observées au microscope électronique à transmission 12
Figure 2 : Schéma structurel d'une mitochondrie 15
Figure 3 : Cascades de signalisation de la biogenèse mitochondriale 17
Figure 4 : Schématisation de la glycolyse 19
Figure 5 : Schématisation de la β-oxydation des acides gras 21
Figure 6 : Schématisation du cycle de Krebs 23
Figure 7 : Schématisation de la phosphorylation oxydative 25
Figure 8 : Carte génétique de l'ADN mitochondrial Humain 27
Figure 9 : Représentation du réplisome minimal mitochondrial humain 29
Figure 10 : Réplication de l'ADNmt d'après le modèle de déplacement de brin 29
Figure 11 : Les pathologies mitochondriales en fonction du tissu touché 34
Figure 12 : Coupe d'apex de cœur de souris K320E-Twinkle^{Myo}-*Opa1^{delTTAG}* de 18 mois ayant subi une coloration COX/SDH 36
Figure 13 : Mosaïque de cellules COX-déficientes chez l'homme vieillissant 36
Figure 14 : Notion d'hétéroplasmie 38

Figure 15 : Représentation schématique d'une molécule d'ADNmt délétée ou dupliquée 40

Figure 16 : Emplacement des différentes délétions ciblées sur l'ADNmt.....41

Figure 17 : Formation des délétions de l'ADNmt.....43

Figure 18 : Structure hexamèrique de l'hélicase mitochondriale Twinkle 45

Figure 19 : Schématisation de l'organisation des domaines de la protéine Twinkle.....46

Figure 20 : Mutations de *TWNK* connues et pathologies associées 46

Figure 21 : Schématisation des mécanismes impliqués dans la dynamique mitochondriale 49

Figure 22 : Domaines structuraux des Mfns.....50

Figure 23 : 8 isoformes de OPA1 chez l'homme 53

Figure 24 : Modèle de fusion mitochondriale chez les mammifères 54

Figure 25 : Domaines structuraux de Drp1 55

Figure 26 : Structure de FIS1 57

Figure 27 : Structure de protéines impliquées dans la fission mitochondriale ...58

Figure 28 : Modèle de fission mitochondriale chez les mammifères.....59

Figure 29 : Les trois types d'autophagie.....64

Figure 30 : Les étapes de la macroautophagie / mitophagie classique.....66

Figure 31 : Les 3 types de mitophagie 68

Figure 32 : Représentation schématique de la mitophagie Parkin-dépendante..70

Figure 33 Domaines, organisation et activation de Parkin.....71

Figure 34 : Mitophagie indépendante de PINK1-Parkin 75

Figure 35 : Flux autophagique.....76

Figure 36 : Pathologies associées à des défauts de mitophagie.....79

Figure 37 : Répartition semi-prévisionnelle de la population mondiale âgée de moins de 5 ans ou plus de 65 ans entre 1950 et 2100 80

Figure 38 : Top 10 des pathologies chroniques liées à l'âge 82

Figure 39 : Synthèse des théories du vieillissement 83

Figure 40 : L'origine multifactorielle du vieillissement 84

Figure 41 : Caractérisation anatomique du cœur et de son réseau de conduction 89

Figure 42 : Types de Maladies CardioVasculaires (MCV) 91

Figure 43 : Changements phénotypiques liés à l'âge dans le tissu cardiaque 92

Figure 44 : Le modèle de souris K320E-Twinkle^{Myo} mime le phénotype cardiaque résultant du vieillissement humain.....113

Figure 45 : Schématisation de la réduction de l'hétéroplasmie par le CQ de l'ADNmt.....118

Figure 46 : Stratégie de croisement ayant permis d'obtenir le modèle K320E-Twinkle^{Myo}.....120

Figure 47 : Stratégie de conception de la lignée de souris *Drp1*$^{+/-}$.....122

Figure 48 : Stratégie de conception de la lignée de souris *Opa1*^{delTTAG} 122

Figure 49 : Positionnement des délétions les plus communes de l'ADNmt chez la souris 129

Figure 50 : Image de la construction de l'E-Gel™ 132

Figure 51 : Méthodologie des comptages effectués sur coupes de cœur de souris 140

Figure 52 : Exemple d'une image déconvoluée par Huygens® et à laquelle une surface virtuelle a été appliquée sur les nucléoïdes marqués au Picogreen® via Imaris® pour en extraire diverses données.....142

Figure 53 : Positionnement de la puce de télémétrie HD-X10 lors de l'implant chez la souris.....143

Figure 54 : Schéma logique du choix de test statistique 145

Figure 55 : Migration des produits de la PCR de génotypage à partir des cœurs de souris sur gel d'agarose.....147

Figure 56 : Validation des modèles d'altérations de la dynamique chez K320E-Twinkle^{Myo} par semi-quantification des protéines OPA1 et DRP1 dans les cœurs de souris de 18 mois par Simple Western® 148

Figure 57 : Impact des mutations des modèles murins sur le poids du corps et du cœur.....149

Figure 58 : Impact quantitatif et qualitatif de la modulation de la dynamique mitochondriale sur l'ADNmt chez K320E-Twinkle^{Myo}.....151

Figure 59 Analyse des délétions de l'ADNmt chez les souris de 18 mois 152

Figure 60 : Impact de la modulation de la dynamique mitochondriale sur la COX-déficience des cardiomyocytes et myocytes des souris K320E-Twinkle^{Myo} de 18 mois 154

Figure 61 : ECGs caractéristiques des modèles de souris K320E-Twinkle^{Myo}, *Opa1^{delTTAG}* et double-mutants 156

Figure 62 : Evolution du poids des souris lors du traitement au M1 158

Figure 63 : Impact du M1 fusion promoter sur la production d'OPA1 chez les souris WT et K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois 160

Figure 64 : Impact du M1 fusion promoter sur le taux de copie d'ADNmt présentant une délétion dans le cœur et les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois 162

Figure 65 : Le M1 fusion promoter n'a pas d'impact significatif sur le taux de cardiomyocytes COX^{-} chez K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois 163

Figure 66 : Caractérisation de l'activité de la mitophagie basale chez les souris K320E-Twinkle^{Myo} 166

Figure 67 : Immunofluorescence de marqueurs de la mitophagie sur CM isolés de souris WT et K320E-Twinkle^{Myo} de 18 mois 167

Figure 68 : Evolution du poids des souris lors du traitement à l'UA 169

Figure 69 : Validation de l'impact du traitement à l'Urolithine A sur l'activité de mitophagie chez les souris contrôles et K320E-Twinkle^{Myo} à 18 mois 171

Figure 70 : Impact de l'UA sur le taux de copie d'ADNmt présentant une délétion dans le cœur et les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois 172

Figure 71 : L'Urolithine A n'a pas d'impact significatif sur le taux de cellules COX^{-} dans le cœur des souris K320E-Twinkle^{Myo} à 18 et 24 mois.. 173

Figure 72 : Anatomie de l'œil et de la rétine. 184

Figure 73 : Symptômes principaux de l'Atrophie Optique Dominante 187

Figure 74 : Structure et prédiction de pathogénicité du variant Y506C de Twinkle 189

Figure 75 : Informations sur le patient Y506C 190

Figure 76 : Carte du plasmide contenant la séquence codante de *TWNK* 193

Figure 77 : Carte du plasmide d'expression pIRES2-eGFP 195

Figure 78 : Observation au microscope confocal à épifluorescence du réseau mitochondrial et de la structuration des nucléoïdes d'UACC-62 transfectées avec différents variants de *TWNK*.....202

Figure 79 : Impact des variants de *TWNK* transfectés en UACC62 sur la la quantité d'ADNmt et son intégrité.....203

Figure 80 : Impact de la mutation Y506C sur la stabilité de l'ADNmt.....205

Figure 81 : Impact du variant Y506C de TWINKLE sur la morphologie mitochondriale dans les fibroblastes.....206

Figure 82 : Coupes de soléaires ayant subi une double coloration enzymatique COX/SDH chez les animaux WT et K320E-Twinkle^{Myo} dotés ou non des génotypes *Drp1*$^{+/-}$ ou *Opa1*^{delTTAG}.....210

Figure 83 : Observation de regroupement de mitochondries anormales dans les muscles des souris K320E-Twinkle^{Myo}.....212

Figure 84 : Observations au scanner de coupes de muscles de souris K320E-Twinkle^{Myo} de fibres musculaires caractéristiques de pathologies mitochondriales.....214

Table des tableaux

Tableau 1 : Composition lipidique des membranes mitochondriales interne et externe chez le rat et le porc 14

Tableau 2 : Différences entre codes génétiques universel et mitochondrial 26

Tableau 3 : Modifications post-traductionnelles clés de DRP1 56

Tableau 4 : Syndromes cliniques dus à des mutations dans les gènes codant les composants des machines de fission et de fusion 61

Tableau 5 : Identification génotypique des différentes souris, modèles d'instabilité de l'ADNmt et/ou d'altération de la dynamique mitochondriale ... 123

Tableau 6 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour initier les PCR 127

Tableau 7 : Préparation pour PCR classique 128

Tableau 8 : Programme de PCR classique 128

Tableau 9 : Préparation pour qPCR 129

Tableau 10 : Programme de qPCR 129

Tableau 11 : Préparation pour PCR demi-longue 130

Tableau 12 : Programme de PCR demi-longue pour NGS 130

Tableau 13 : Préparation des fragments d'ADNmt pour séquençage NGS 131

Tableau 14 : Préparation pour ligation des adaptateurs de séquençage NGS .. 131

Tableau 15 : Préparation pour PCR d'amplification de la librairie (NGS) 132

Tableau 16 : Programme de la PCR d'amplification de la librairie (NGS) 133

Tableau 17 : Liste des anticorps utilisés 134

Tableau 18 : Composition du tampon d'extraction de protéines 135

Tableau 19 : Liste des amorces nucléotidiques utilisées pour initier les PCR sur cellules humaines 197

Tableau 20 : Préparation pour Nested PCR « OUT » 199

Tableau 21 : Programme de Nested PCR « OUT » 199

Tableau 22 : Préparation pour Nested PCR « IN » 199

Tableau 23 : Programme de Nested PCR « IN » 199

Titre : Dynamique mitochondriale et mitophagie : cibles thérapeutiques dans les cardiopathies liées à l'instabilité génomique mitochondriale au cours du vieillissement ?

Mots clés : Vieillissement, cœur, COX-déficience, ADN mitochondrial, dynamique mitochondriale, mitophagie

Résumé : Les maladies cardiovasculaires sont la 1ère cause de mortalité dans monde et l'on observe fréquemment, dans le cœur vieillissant, une mosaïque de quelques cellules dont la fonction mitochondriale est altérée au sein de nombreuses cellules saines, et qui pourrait jouer un rôle dans le vieillissement pathologique du cœur. Cette dysfonction résulte de l'instabilité de l'ADN mitochondrial (ADNmt), qui subit de nombreuses délétions lors du vieillissement. L'étude vise à déterminer l'impact de contrôles qualité mitochondriaux, la dynamique mitochondriale et la mitophagie, sur l'instabilité de cet ADNmt au cours du vieillissement, en les modulants dans le modèle murin K320E-TwinkleMyo, qui présente une accumulation accélérée de délétions de l'ADNmt dans le cœur et les muscles. Nous montrons que les souris K320E-TwinkleMyo présentent une mitophagie exacerbée en condition basale, et que l'haplo-insuffisance en protéine de fusion mitochondriale OPA1 entraine un doublement du taux de cardiomyocytes déficients en activité mitochondriale dans ce modèle, sans altérer le taux de délétions de l'ADNmt, suggérant un rôle protecteur de la fusion mitochondriale qui pourrait se situer au niveau du contrôle des seuils critiques d'hétéroplasmie de l'ADNmt muté. Des traitements pharmacologiques avec deux molécules visant à stimuler la fusion et le renouvellement mitochondrial n'ont cependant pas permis de restaurer un phénotype cardiaque sain chez les souris K320E-TwinkleMyo, impliquant que de nouvelles recherches sont nécessaires pour comprendre ces phénomènes.

Title: Mitochondrial dynamics and mitophagy: therapeutic targets in heart diseases linked to mitochondrial genomic instability during aging?

Keywords: Aging, heart, COX-deficiency, mitochondrial DNA, mitochondrial dynamics, mitophagy

Abstract: Cardiovascular diseases are one of the leading causes of mortality in the world. In the aging heart, a mosaic of a few cells with mitochondrial dysfunction among many healthy cells is observed, which could play a major role in pathological cardiac aging. This dysfunction results from the instability of mitochondrial DNA (mtDNA), which undergoes numerous deletions during aging. The study aims to determine the impact of mitochondrial quality control mechanisms, mitochondrial dynamics and mitophagy, on mtDNA instability during aging, by modulating them in the K320E-TwinkleMyo mouse model, which presents an accelerated accumulation of mtDNA deletions in heart and muscle. We show that K320E-TwinkleMyo mice exhibit exacerbated mitophagy in basal conditions, and that haploinsufficiency of the mitochondrial fusion protein OPA1 leads to the accumulation of 2 times more cardiomyocytes with deficient mitochondrial activity, without altering the levels of mtDNA deletions. This suggests a protective role of mitochondrial fusion, potentially by controlling the critical heteroplasmy thresholds of mutated mtDNA. Pharmacological treatments with two molecules aimed at stimulating mitochondrial fusion and mitochondrial renewal, however, failed to restore a healthy cardiac phenotype in K320E-TwinkleMyo mice, implying that further research is needed to understand these phenomena.