

Université  
de Toulouse

# THESE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Gène, Cellule et Développement*

---

Présentée et soutenue par *BERTHOLET Ambre Marguerite Solange*  
Le 28 octobre 2011

Titre : *Influence de la protéine de fusion mitochondriale OPA1 sur  
le métabolisme oxydatif neuronal et la transmission synaptique*

---

### JURY

<i>M. Jean-Claude MARTINOU, Professeur, Université de Genève, Suisse</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>M. Igor MEDINA, Directeur de Recherche, INSERM, INMED, Marseille-Luminy</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>M. Pascal REYNIER, Professeur, INSERM, C.H.U. d'Angers</i>	<i>Rapporteur</i>
<i>M<sup>me</sup> Pascale CHAVIS, Chargée de Recherche, INSERM, INMED, Marseille-Luminy</i>	<i>Examinatrice</i>
<i>M. Jean-Michel PEYRIN, Chargé de Recherche, CNRS UMR 7102, UPMC, Paris</i>	<i>Examineur</i>
<i>M<sup>me</sup> Pascale BELENGUER, Professeur, UPS, CBD, Toulouse</i>	<i>Directrice de thèse</i>
<i>M<sup>me</sup> Marie-Christine MIQUEL, Enseignant-Chercheur, UPMC, CBD, Toulouse</i>	<i>Directrice de thèse</i>

---

Ecole doctorale : *Biologie Santé Biotechnologie de Toulouse*  
Unité de recherche : *CNRS UMR 5547 UPS*  
Directrices de Thèse : *Pascale BELENGUER et Marie-Christine MIQUEL*

Je remercie tout d'abord les membres du jury Mr Martinou, Mr Medina, Mr Reynier et Mr Peyrin d'avoir accepté de juger ce travail de thèse.

Merci à tous les membres du LBCMCP, du MPM et du CBD de leur accueil et leur disponibilité.

Mais surtout :

Merci à toi Pascale d'avoir eu l'envie de travailler avec moi. C'était pourtant mal parti étant donné le choix premier qui ne dépendait pas de toi et qui penchait plus vers d'autres candidats autrement plus charismatiques que moi. Tu as insisté pour que j'intègre ton équipe et nous deux ça a marché. Comme quoi, je n'ai peut-être pas la moustache mais grâce au travail et à l'apprentissage de la persévérance, cette thèse s'est bien déroulée.

Merci à toi MC d'être venue travailler avec moi. Comme tous les cadeaux que l'on n'attend pas, ton arrivée surprise m'a offert une bouffée d'air frais et surtout une grande aide psychologique, psychiatrique et chocolatrique. Et oui, les kilos en trop, c'est à cause de toi ! On s'est bien marré devant le FACS ou encore devant les ventres ouverts des rates ensanglantées...

Merci à toi Pascale de m'avoir appris la magie de l'électrophysiologie. C'est grâce à cette rencontre que j'ai eu l'envie de continuer avec cette fabuleuse technique mais d'une autre manière. Quand même patcher des mitochondries, il fallait y penser. Mais surtout, c'est rare de trouver une personne qui apprécie autant que moi les andouillettes. Ah oui, et Marseille, super institut parmi les calanques et les œuvres d'art. Et puis, bien sûr Olivier, que dire. Juste super cool.

Merci à ma collègue aveyronnaise. Heureusement que tu étais là pour comprendre que le roquefort est le meilleur fromage après celui de mes parents et que Rodez est la capitale de la France... ou presque... Bon, côté colonisation de ta paillasse et de ton bureau, tu as été très patiente. Je vais reprendre mes cours de géopolitique là-bas dans ma maison bleue.

Merci à tout le reste de l'équipe : Laetitia, Noélie, Valérie, Aurélie, Laurent, Thomas et Oriane. Et les absents : Ingrid, Delphine, Thomas, Farnoosh.

Merci à toi Géraldine de la passation de la culture primaire de neurones. C'était cool de t'avoir avec moi pour tous ces moments à partager la hotte. Pourquoi tu es partie !!!!

Merci à toi Alban, mon meilleur copain de labo. Je me souviendrais toujours des karaokés tardifs laborantins avec Demis Roussos et Mort Shuman. Comme pour Bob Dylan, je ne sais pas s'ils sont déjà morts mais bon, leurs tubes sont intemporels et toujours vivants dans nos cœurs.

A vous Albert et Romino (Isa), de votre soutien culinaire et vos breuvages si anxiolytiques. Six plats montagnards en 2 jours, vous avez bien assuré. Vous avez intérêt à ne pas m'oublier. On pourrait même vivre en communauté quand je reviendrai de là-bas, du pays des bobos.

À vous mes potes de Marseille de la Manzoni's family (JiJi, Ol et Aur) et Bob, vous m'avez grandement soutenue pour cette dernière année de thèse. Il faut dire que je suis facile... Bon, vous me direz que c'est à vous de juger. Mais moi, je peux juger de votre gentillesse, de votre soutien et de votre disponibilité. Allez, on se revoit bientôt.

Et encore, merci Johnny, Benoît/Laure, Steph/Manu, Laure

Ah les neurones, sacrés spécimens...

Et puis, quand même, merci à vous papa et maman de votre soutien sans bornes (non mais quand même, ch'uis vot' seule fille !). Je vous l'accorde, un peu longues ces études. Vous m'aviez dit de bien travailler à l'école... J'ai le droit de faire du droit maintenant ?

Allez, Looloo cette thèse est pour toi, toi mon seul frère. Tu t'occuperas de moi plus tard ?

À mon Alex, qui me suit depuis nos quinze ans. Ah, cette cabine téléphonique à l'internat qui essayait nos larmes de croco... Merci d'avoir pris en charge mon fréro et d'avoir réussi à en sortir le meilleur : Matisse. Toi, mon neveu, ne fais pas comme tatie, ne fais pas de longues études. Cherche toi un vrai travail !

Merci à Grand-Mère, 'ncle Japy et mes autres tontons et tatas. A Eugénie. À ma Vanetch et tous les autres.

À Pierrot.

À Sophie et Gérard

À Olivier du violon, à Marie-Pierre que la vie a trop vite rappelé à elle.

À toi





# SOMMAIRE

<b>SOMMAIRE</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>9</b>
<b>PREAMBULE</b> .....	<b>13</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>17</b>
<b>I. LES MITOCHONDRIES</b> .....	<b>17</b>
<b>I-1- Généralités</b> .....	<b>17</b>
I-1-1- Structure et composition .....	17
I-1-2- Les fonctions mitochondriales .....	21
I-1-2-1- Cycle de Krebs et phosphorylation oxydative.....	21
I-1-2-2- L'apoptose .....	25
I-1-2-3- Le calcium .....	27
I-1-2-4- Les Espèce Actives de l'Oxygène.....	31
I-1-2-4-1- Production.....	31
I-1-2-4-2- Mécanismes de détoxification.....	33
I-1-2-4-3- Homéostasie redox et stress oxydant.....	35
I-1-2-4-4- La signalisation EAOs .....	39
I-1-2-4-5- NRF2.....	41
<b>I-2- La dynamique mitochondriale</b> .....	<b>43</b>
I-2-1- Définition, caractéristiques, mesure.....	43
I-2-2- Acteurs et mécanistique de la fission mitochondriale .....	47
I-2-2-1- Les acteurs essentiels de la fission mitochondriale.....	47
I-2-2-2- Autres acteurs ou régulateurs de la fission .....	51
I-2-2-3- Existe-t-il une machinerie de fission de la membrane interne ? .....	53
I-2-2-4- Modèle de fission .....	53
I-2-3- Acteurs et mécanistique de la fusion mitochondriale .....	55
I-2-3-1- Les acteurs essentiels de la membrane externe : MFN1-2 .....	55
I-2-3-2- L'acteur essentiel de la membrane interne : OPA1 .....	57
I-2-3-3- D'autres acteurs de la fusion .....	61
I-2-3-4- Couplage de la fusion des deux membranes .....	63
I-2-4- Dynamique mitochondriale et fonctions des mitochondries .....	63
I-2-4-1- Le maintien du génome mitochondrial .....	65
I-2-4-2- L'apoptose .....	67
I-2-4-3- La phosphorylation oxydative.....	69
I-2-4-4- Contrôle qualité .....	71
I-2-4-5- La gestion du calcium .....	73
I-2-5- Les maladies associées.....	75
I-2-6- Modèles animaux de dysfonctions de la dynamique mitochondriale .....	81
<b>II. LES NEURONES : SYNAPSES ET MALADIES NEURODEGENERATIVES</b> .....	<b>87</b>
<b>I-1- Transmission glutamatergique (Illustration 16 A)</b> .....	<b>89</b>
II-1-1- Les récepteurs métabotropiques du glutamate.....	91
II-1-2- Les récepteurs ionotropiques du glutamate.....	91
<b>I-2- Transmission GABAergique (Illustration 16 B)</b> .....	<b>95</b>
II-2-1- Les récepteurs métabotropiques GABA-B.....	97
II-2-2- Les récepteurs ionotropiques GABA-A .....	97
<b>I-3- Synaptogenèse et maturation neuronale (Illustration 17)</b> .....	<b>99</b>
<b>I-4- Interactions entre compartiments pré et post-synaptiques (Illustration 18)</b> .....	<b>101</b>
<b>I-5- Plasticité synaptique : potentialisation et dépression à long terme</b> .....	<b>103</b>
<b>I-6- Maladies neurodégénératives</b> .....	<b>105</b>
II-6-1- Maladie d'Alzheimer .....	107
II-6-2- Maladie de Parkinson .....	109
II-6-3- Maladie de Huntington.....	111
<b>III- MITOCHONDRIES ET NEURONES</b> .....	<b>113</b>
<b>III-1- Production d'ATP et gestion du calcium</b> .....	<b>113</b>
<b>III-2- Mobilité et distribution mitochondriales dans les neurones</b> .....	<b>115</b>
III-2-1- Transport antérograde (Illustration 20).....	115
III-2-2- Transport rétrograde (Illustration 20) .....	117
III-2-3- Immobilisation des mitochondries .....	117
III-2-4- Régulation de la mobilité des mitochondries .....	119
<b>III-3- Dynamique mitochondriale dans les neurones</b> .....	<b>121</b>
III-3-1- Distribution et dynamique mitochondriales.....	121

III-3-2- Maladies neurodégénératives et dynamique mitochondriale.....	123
III-2-5- Dynamique mitochondriale et transmission synaptique .....	127
<b>PROBLEMATIQUE.....</b>	<b>131</b>
<b>RESULTATS .....</b>	<b>133</b>
I- MISE EN PLACE D'UN MODELE CELLULAIRE NEURONAL POUR L'ETUDE D'OPA1 .....	133
II- CARACTERISATION DU MODELE.....	137
I-2- <i>Caractérisation de la morphologie des mitochondries au cours de la maturation neuronale</i> .....	137
I-2-1- Morphologie des mitochondries.....	137
I-2-2- Expression des acteurs de la dynamique mitochondriale.....	139
I-3- <i>Caractérisation de l'activité mitochondriale au cours de la maturation des neurones</i> .....	141
I-3-1- Évolution du potentiel de membrane mitochondrial.....	141
I-3-2- Evolution des EAOs.....	143
III- INFLUENCE D'OPA1 SUR LA MORPHOLOGIE ET LE FONCTIONNEMENT DES MITOCHONDRIES DANS LES NEURONES, IMPACT SUR LA MATURATION NEURONALE.....	149
III-1- <i>Mise en place de la stratégie d'extinction d'OPA1</i> .....	149
III-2- <i>Extinction d'OPA1 et morphologie mitochondriale</i> .....	151
III-3- <i>Extinction d'OPA1 et fonctions mitochondriales</i> .....	153
III-4- <i>Extinction d'OPA1 et état redox</i> .....	155
III-5- <i>Extinction d'OPA1 et maturation des neurones</i> .....	159
IV- INFLUENCE D'OPA1 SUR LA TRANSMISSION SYNAPTIQUE .....	161
IV-1- <i>Système expérimental</i> .....	161
IV-1-1- Culture primaire de neurones corticaux murins post-nataux.....	161
IV-1-2- Patch-clamp : enregistrement 'cellule entière' .....	163
IV-2- <i>Etude de la transmission glutamatergique</i> .....	167
IV-2-1 Etude des courants excitateurs miniatures (mCPSE).....	167
IV-2-2- Etude des courants excitateurs spontanés (spCPSE) .....	169
IV-2-3- Etude de l'influence de l'expression d'un mutant dominant négatif (G300E) d'OPA1 sur la transmission synaptique excitatrice .....	177
IV-2-4- Restauration pharmacologique de la transmission glutamatergique.....	181
IV-3- <i>Etude de la transmission GABAergique</i> .....	187
IV-4- <i>Effet de la perte d'OPA1 sur la morphologie des neurones</i> .....	191
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>193</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>235</b>
<b>MATERIELS ET METHODES .....</b>	<b>237</b>
I- CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES DE CORTEX D'EMBRYONS DE RAT E17 .....	237
I-1- <i>Prélèvement, microdissection et mise en culture</i> .....	237
I-2- <i>Culture, viabilité cellulaire</i> .....	238
I-3- <i>Immunofluorescence indirecte</i> .....	238
I-4- <i>Mesure de la quantité d'EAOs</i> .....	239
I-5- <i>Protocole de décollement des neurones pour tests enzymatiques</i> .....	240
I-6- <i>Mesure de l'état redox</i> .....	240
I-7- <i>Mesure de l'activité Aconitase</i> .....	241
I-8- <i>Mesure de l'activité Catalase</i> .....	241
I-9- <i>Mesure du potentiel de membrane mitochondrial</i> .....	242
I-10- <i>Transfection des cultures embryonnaires par électroporation</i> .....	242
I-11- <i>Électrophorèse, transfert, immunodétection</i> .....	242
I-12- <i>Analyse morphométrique des mitochondries</i> .....	244
II- CULTURE PRIMAIRE DE CELLULES DE CORTEX DE SOURICEAUX POST-NATAUX P0.....	245
II-1- <i>Animaux, prélèvements et microdissection</i> .....	245
II-2- <i>Transfection chimique par lipofection</i> .....	246
II-3- <i>Transduction virale</i> .....	246
II-4- <i>Immunofluorescence indirecte</i> .....	246
II-5- <i>Électrophysiologie</i> .....	247
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>251</b>





## ABREVIATIONS

AAA : « ATPase associated with varied activities »  
Acétyl CoA : acétyl-coenzyme A  
ADOA : atrophie optique dominante autosomale  
ADOA-1 : atrophie optique dominante autosomale de type 1  
ADOAC : atrophie optique autosomique dominante et cataracte  
AFG3L1 et AFG3L2 : « ATPase family gene 3-like »  
AKAP : « A-kinase anchor proteins »  
AIF : « apoptosis inducing factor »  
AMPA : alpha-amino-3-hydroxy-5méthyl-4-isoxazolepropionate  
AMPA : récepteur de l'alpha-amino-3-hydroxy-5méthyl-4-isoxazolepropionate  
AP-5 : acide 2-amino-5-phosphonopentanoïque  
APP : « amyloid precursor protein »  
AraC : arabinoside C  
ARE : « antioxidant responsive element »  
ATP : adénosine tri-phosphate  
Bak : « Bcl-2 homologous antagonist-killer »  
Bax : « Bcl-2-associated X protein »  
Bcl-2 : « B-cell leukemia protein-2 »  
Bcl-xl : « B-cell lymphoma-extra large »  
BrdU : 5-bromo-2'-deoxyuridine  
Ca<sup>2+</sup> / H (ou Ca seul et H seul ??)  
Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> NCLX/NCX  
CaMKI $\alpha$  : protéine kinase 1 $\alpha$  dépendante de la calmoduline  
CB1 : récepteur cannabinoïde 1  
CC : « coiled-coil »  
CD4 : cluster de différenciation 4  
CGR : cellules ganglionnaires de la rétine  
CMT : Charcot Marie Tooth  
CMT2A : Charcot Marie Tooth de type 2A  
CNQX : 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione  
CPSI : courants post-synaptiques inhibiteurs  
CRAC : « calcium-release activated calcium current »  
Dnm1 : dynamine 1  
DNP : dinitrophénol  
DRP1 : « dynamin-related protein 1 »  
EAAT : « excitatory amino acid transporter »  
EAOs : espèces actives de l'oxygène  
eat-3 : « eating abnormal 3 »  
endoG : endonucléase G  
FAD, FADH<sub>2</sub> : flavine adénine dinucléotide, formes oxydée et réduite  
Fe-S : Fer-Soufre  
FEZ1 : « fasciculation and elongation protein zeta 1 »  
Fis1 : « fission 1 »  
FMN, FMNH<sub>2</sub> : flavine mononucléotide formes oxydée et réduite  
FRET : « fluorescence resonance energy transfert »  
FSK : forskoline  
FZO1 : « fuzzy onion 1 »  
GABA : « gamma-aminobutyric acid »  
GABA-A : récepteurs GABA de type A  
GABA-B : récepteurs GABA de type B  
GAD-65 et 67 : glutamate-décarboxylase, isoforme de 65 ou 67 kdaltons  
GAT1 à GAT4 : GABA transporter 1 à 4

GDAP1 : « ganglioside-induced differentiation associated protein 1 »  
 GED : « GTPase effector domain »  
 GFAP : « Glial fibrillary acidic protein »  
 GFP : « green fluorescent protein »  
 GluR1 : « Glutamate receptor 1 »  
 GPx : glutathion peroxydase  
 GSSG, GSH : glutathion, formes oxydée et réduite  
 GTP : guanosine triphosphate  
 H2-DCFDA : 2',7' -dichlorofluorescéine diacétate  
 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> : peroxyde d'hydrogène  
 HDAC6 : « Histone deacetylase 6 »  
 HIF : « hypoxia inducible factor »  
 HPLC : « High-performance liquid chromatography »  
 HR1 : « heptad repeat 1 »  
 HSP60 : « Heat shock protein » de 60 kdaltons  
 i-AAA : « intermembrane space-facing AAA protease »  
 IAP : « inhibitors of apoptosis proteins »  
 IEI : intervalles entre évènements  
 iGluR : « ionotropic glutamate receptors »  
 IκB : « inhibitory kappa B protein »  
 IP3R : inositol-1,4,5-triphosphate receptor »  
 JC-1 : 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide  
 KA1/KA2 : sous-unités du récepteur kaïnate  
 K-ATP : « ATP-sensitive potassium channel »  
 KCC2 : « K<sup>+</sup>Cl<sup>-</sup> co-transporter 2 »  
 Keap1 : « Kelch ECH associating protein 1 »  
 KIF1B : « kinesin family member 1B »  
 LC3 : « microtubule-associated protein light chain 3 »  
 Letm1 : « leucine zipper-EF-hand containing transmembrane protein 1 »  
 LRRK2 : « leucine rich repeat kinase 2 »  
 LTP : potentialisation à long terme  
 LTD : dépression à long terme  
 LUC : luciférine  
 m-AAA : « matrix-facing AAA protease »  
 MAP2 : « microtubule-associated protein 2 »  
 MAPK : « mitogen activated protein kinase »  
 MAPL : mitochondrial-anchored protein ligase »  
 MARCH : « membrane-associated RING-CH protein »  
 mCU : « mitochondrial calcium uniporter »  
 Mdivi-1 : « mitochondrial division inhibitor 1 »  
 MDM33 : mitochondrial distribution and morphology  
 Mff : « mitochondrial fission factor »  
 MFN : mitofusine  
 mCPSE : courants excitateurs miniatures  
 mGluR : « metabotropic glutamate receptor »  
 Mgm1 : « mitochondrial genome maintenance »  
 MIB : « E3 ubiquitin-*protein* ligase mind-bomb »  
 Miro : « mitochondrial Rho-GTPase »  
 MIS : « mitochondrial import sequence »  
 mitoPLD : « mitochondrial phospholipase D »  
 MOI30 : « multiplicity of infection 30 »  
 MPTP : 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine  
 MTGM : « mitochondrial targeting GxxxG motif »  
 OGG1 : « 8-Oxoguanine glycosylase 1 »  
 Msp1 : mgm1 de *Schizosaccharomyces pombe*

NAD<sup>+</sup>, NADH, H<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide, formes oxydée et réduite  
 NADP, NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate, formes oxydée et réduite  
 NCAM : « Neural Cell Adhesion Molecule »  
 ND : NADH dehydrogenase  
 NeuN : « neuronal nuclei »  
 NFκB : « nuclear factor-κB »  
 NGF : « nerve growth factor »  
 NLS : « nuclear localization sequence »  
 NMDA : N-méthyl-D-aspartate  
 NMDAR : « NMDA receptor »  
 NO : monoxyde d'azote  
 NOX : NADP(H) oxydases  
 NR1, NR2A à D et NR3A/B : sous unités récepteurs NMDA  
 NRF2 : « nuclear factor-erythroïd 2-related factor 2 »  
 O<sub>2</sub><sup>-</sup> : anion superoxyde  
 OMA1 : « Outer Membrane Auxiliary »  
 OPA1 : « optic atrophy 1 »  
 Oxa : « Oxidase assembly protein 1 »  
 OXPHOS : « Oxidative phosphorylation »  
 PA : potentiels d'action  
 PAM : « presequence associated translocase motor »  
 PARL : « presenilin associated rhomboïd like protease »  
 PEG : polyéthylène glycol  
 PHB2 : « Prohibitin-2 »  
 Pi : phosphate inorganique  
 PI3 : phosphoinositide 3  
 PINK1 : « PTEN putative kinase 1 »  
 PKA : protéine kinase A  
 PKC : protéine kinase C  
 PTP : pore de transition de perméabilité  
 PSD-95 : « postsynaptic density protein 95 »  
 PSD : post-synaptique  
 RanBP2 : « RAN binding protein 2 »  
 RCPG : protéines G hétérotrimériques  
 ROOH : hydroperoxydes  
 S100β : « beta subunit of the S100 protein »  
 SAM : « sorting and assembly machinery »  
 SDS-PAGE : « sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis »  
 SH : groupements sulfhydryles  
 siARN : « small interfering » ARN  
 SIMH : « stress-induced mitochondrial hyperfusion »  
 shARN : « small hairpin » ARN  
 SLP-2 : « stomatin-like protein 2 »  
 Smac/Diablo : « second mitochondrial activator of caspases / direct IAP binding protein of low PI »  
 SOD : superoxydes dismutases  
 SPFH : « stomatin/prohibitin/flotillin/hflk »  
 spCPSE : courants excitateurs spontanés  
 STIM1 : « Stromal interaction molecule 1 »  
 SynCAM : « synaptic cell adhesion molecule »  
 TAU : « Tubule Associated Unit »  
 TIM : translocase de la membrane Interne  
 TM1 : domaine hydrophobe potentiellement transmembranaire  
 TOB : « translocase of outer membrane β-Barrel protein »  
 TOM : translocase de la membrane externe

TTX : tétrodotoxine

Ubc9 : « Ubiquitin-conjugating enzyme 9 »

Ugo1 : « *ugo* is Japanese for fusion »

Yme1L : « yeast mitochondrial escape 1-like »

VDAC : « voltage-dependent anion channels »

VGAT : « vesicular GABA transporter »

vGLUT : « vesicular glutamate transporter »

## LISTE DES FIGURES

<b>Illustration 1:</b> La mitochondrie et ses compartiments.....	16
<b>Illustration 2:</b> Organisation de l'ADN mitochondrial humain.....	18
<b>Illustration 3:</b> Les voies d'import et d'adressage des protéines mitochondriales.....	20
<b>Illustration 4:</b> Schéma du fonctionnement mitochondrial.....	22
<b>Illustration 5:</b> Schéma de la gestion calcique mitochondriale.....	26
<b>Illustration 6:</b> Sites de production des EAOs mitochondriales.....	30
<b>Illustration 7:</b> Les deux modes d'altérations cellulaires dus à une élévation de la concentration d'EAOs aigüe ou chronique.....	34
<b>Illustration 8:</b> Signalisation du facteur de transcription NRF2.....	40
<b>Illustration 9:</b> Morphologie mitochondriale.....	42
<b>Illustration 10:</b> Tests de fusion mitochondriale.....	44
<b>Illustration 11:</b> Modèles des mécanismes de fission impliquant DRP1.....	52
<b>Illustration 12:</b> Représentation schématique de la protéine OPA1 et ses 8 variants d'épissage humains.....	56
<b>Illustration 13:</b> OPA1, maintien du génome et structuration des crêtes mitochondriales.....	64
<b>Illustration 14:</b> Les neurones, cellules hautement asymétriques et polarisées.....	86
<b>Illustration 15:</b> La synapse.....	88
<b>Illustration 16:</b> Synapses glutamatergique (A) et GABAergique (B) .....	90
<b>Illustration 17:</b> Synaptogenèse et maturation neuronale.....	98
<b>Illustration 18:</b> Liens entre compartiments pré et post-synaptiques .....	100
<b>Illustration 19:</b> La potentialisation et la dépression à long terme.....	102
<b>Illustration 20:</b> Les transports antérograde et rétrograde des mitochondries dans les neurones.....	114
<b>Figure 1:</b> Caractérisation des cellules embryonnaires corticales de rat en culture primaire.....	132/134
<b>Figure 2:</b> Morphologie mitochondriale dans les cellules corticales embryonnaires en culture primaire.....	136
<b>Figure 3:</b> Expression des acteurs de la dynamique mitochondriale dans les cellules corticales.....	138
<b>Figure 4:</b> Expression des acteurs de la dynamique mitochondriale dans les cellules corticales.....	140
<b>Figure 5:</b> Expression des acteurs de la dynamique mitochondriale dans les cellules corticales et chez l'animal.....	142
<b>Figure 6:</b> Evolution du potentiel de membrane mitochondrial autour du pic de filamentation.....	144

<b>Figure 7:</b> Mesure de la quantité d'EAOs.....	146
<b>Figure 8:</b> Modulation de la quantité d'EAOs.....	147
<b>Figure 9:</b> Impact de l'antioxydant Trolox à J6 sur la quantité d'EAOs et sur la longueur des mitochondries.....	148
<b>Figure 10:</b> Evolution du pourcentage de translocation nucléaire de NRF2 au cours de la maturation neuronale.....	148
<b>Figure 11 :</b> Evolution de l'expression d'OPA1 dans les neurones en culture après traitement par différents siARN à J0.....	150
<b>Figure 12 :</b> Effet de l'extinction d'OPA1 sur la morphologie, la distribution des mitochondries et la mort neuronale à J6.....	152
<b>Figure 13:</b> Influence de l'extinction d'OPA1 sur le potentiel de membrane mitochondrial et l'expression des complexes respiratoires dans les cellules corticales.....	154
<b>Figure 14:</b> Influence de l'extinction d'OPA1 sur les enzymes antioxydantes et sur la quantité d'EAOs.....	156
<b>Figure 15:</b> Influence de l'extinction de la protéine OPA1 sur l'état redox des neurones corticaux.....	158
<b>Figure 16:</b> Effets de l'extinction d'OPA1 sur l'arborisation des neurones corticaux et l'expression des protéines synaptiques.....	160
<b>Figure 17:</b> Caractéristiques des neurones co-transfectés avec le traceur CD4 et les siOPA1 et siLUC.....	162
<b>Figure 18 :</b> Schéma explicatif de la technique d'enregistrement électrophysiologique sur cellule entière.....	164
<b>Figure 19:</b> Illustration des courants enregistrés.....	165
<b>Figure 20:</b> Illustration de l'analyse par Axograph des courants enregistrés.....	166
<b>Figure 21:</b> Influence de l'extinction d'OPA1 sur les courants miniatures NMDA.....	168
<b>Figure 22:</b> Influence de l'extinction d'OPA1 sur les courants miniatures AMPA.....	170
<b>Figure 23:</b> Influence de l'extinction d'OPA1 sur les courants spontanés NMDA.....	172
<b>Figure 24:</b> Influence de la transfection sur la distribution cumulée des fréquences des courants spontanés NMDA dans les neurones sans traceur CD4.....	173
<b>Figure 25:</b> Influence de l'extinction d'OPA1 sur les courants spontanés AMPA.....	174
<b>Figure 26:</b> Influence de l'extinction d'OPA1 sur les courants spontanés excitateurs au cours du temps.....	176
<b>Figure 27:</b> Influence de l'inhibition d'OPA1 par le dominant négatif G300E sur la morphologie des mitochondries.....	178
<b>Figure 28:</b> Influence de l'inhibition d'OPA1 par le dominant négatif G300E sur les courants spontanés NMDA.....	180
<b>Figure 29:</b> Influence de l'inhibition d'OPA1 par le dominant négatif G300E sur les courants spontanés AMPA.....	182
<b>Figure 30:</b> Effet de la Forskoline après extinction d'OPA1 sur les courants spontanés NMDA.....	184
<b>Figure 31:</b> Effet de la Forskoline après extinction d'OPA1 sur les courants spontanés AMPA.....	185

<b>Figure 32:</b> Effet d'un traitement Forskoline et de l'extinction d'OPA1 sur la morphologie mitochondriale.....	186
<b>Figure 33:</b> Influence de l'extinction d'OPA1 sur les courants spontanés GABA.....	188
<b>Figure 34:</b> Effet de lentivirus shOPA1 sur la morphologie des mitochondries.....	190



## PRÉAMBULE

Découverte seulement depuis une petite décennie, la dynamique mitochondriale, équilibre entre des forces de fission et de fusion des membranes mitochondriales, a permis d'offrir une dimension plastique à la mitochondrie qui peut adopter une forme filamenteuse ou sphérique suivant le contexte et le type cellulaire. Ce changement de morphologie revêt depuis quelques années un caractère fonctionnel en raison du pouvoir modulateur des protéines de la dynamique mitochondriale sur des fonctions majeures de la mitochondrie. En effet, les acteurs intervenant dans la fission ou ceux de la fusion, participent de manière directe ou indirecte à la phosphorylation oxydative, à l'apoptose, ou encore à la gestion du calcium cytosolique.

La découverte que des mutations des principaux acteurs qui contrôlent la dynamique mitochondriale provoquent des maladies neurodégénératives a révélé que ce processus est particulièrement important au niveau neuronal, alors qu'il intervient dans tous les types cellulaires. Il apparaît donc capital de comprendre l'influence particulière de la dynamique mitochondriale au sein des neurones. C'est dans ce contexte que s'inscrit mon sujet de thèse qui a visé à caractériser le rôle de la protéine de fusion mitochondriale OPA1 dans la mise en place et le fonctionnement des neurones. Ce travail, présenté sous la forme de deux chapitres de résultats, a permis de montrer qu'à travers ses effets sur le métabolisme oxydatif mitochondrial, OPA1 influence la maturation et le fonctionnement électrique des neurones.

Afin de replacer mes travaux dans un contexte général, j'ai choisi de débiter la partie introductive de mon manuscrit par une description générale des fonctions mitochondriales, avec un intérêt particulier pour l'énergétique et la production des Espèces Actives de l'Oxygène mitochondriales. En lien direct avec le rôle de la protéine OPA1 au centre de mes travaux, j'ai ensuite passé en revue les acteurs et la mécanistique de la dynamique mitochondriale pour terminer par une mise en perspective de l'implication de ce processus dans les fonctions de l'organelle et des pathologies qui lui sont associés.

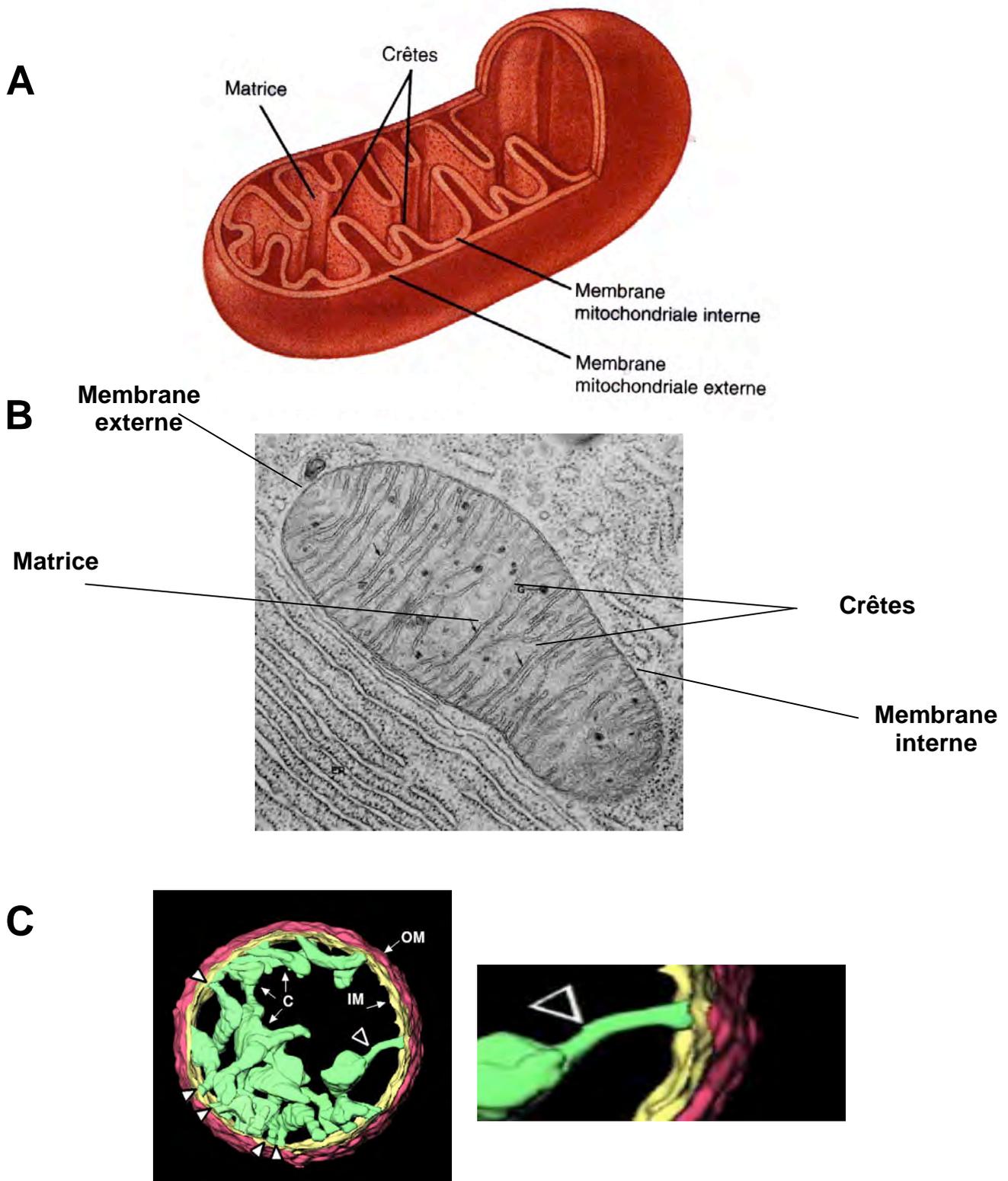
Le second chapitre introductif est dédié à une présentation de mon modèle d'étude, le neurone. Après un bref rappel concernant la structure et le fonctionnement neuronal je me suis principalement focalisée sur la mise en place et le fonctionnement synaptique. Ce chapitre se clôt sur une description des pathologies neurodégénératives.

Enfin, le troisième chapitre introductif met en perspective mitochondries et neurones, par une documentation de l'impact des fonctions mitochondriales dans le contexte neuronal suivie d'un rappel des études récentes concernant l'influence de la dynamique mitochondriale sur le fonctionnement neuronal et son implication dans les maladies

neurodégénératives. Ce chapitre, permet de terminer cette partie introductive par un exposé de ma problématique de recherche.

La dernière partie de mon mémoire reprend les données établies dans la partie résultat pour les discuter et les confronter aux données bibliographiques les plus récentes concernant le rôle des mitochondries et de la dynamique mitochondriale dans les processus de différenciation, de maturation et de fonctionnement des neurones. Les perspectives, courts et moyens terme, offertes par mon travail et concernant aussi bien l'étude de l'impact de la dynamique mitochondriale au niveau neuronal que la compréhension la neuropathie optique provoquée par des mutations de OPA1 sont également présentées dans cette partie du manuscrit.





**Illustration 1: La mitochondrie et ses compartiments**

**A:** Représentation schématique d'une mitochondrie

**B:** Photo en microscopie électronique d'une mitochondrie ([frontiers-in-genetics.org](http://frontiers-in-genetics.org))

**C:** Reconstruction en trois dimensions d'une mitochondrie de foie de rat. La membrane externe est en rouge (OM), la membrane interne (IM) est en jaune et les crêtes mitochondriales en vert (c). Un grossissement permet d'observer les jonctions intra-crêtes qui connectent les crêtes à la membrane interne (tiré de Mannella et al., 2006).

## INTRODUCTION

### I. LES MITOCHONDRIES

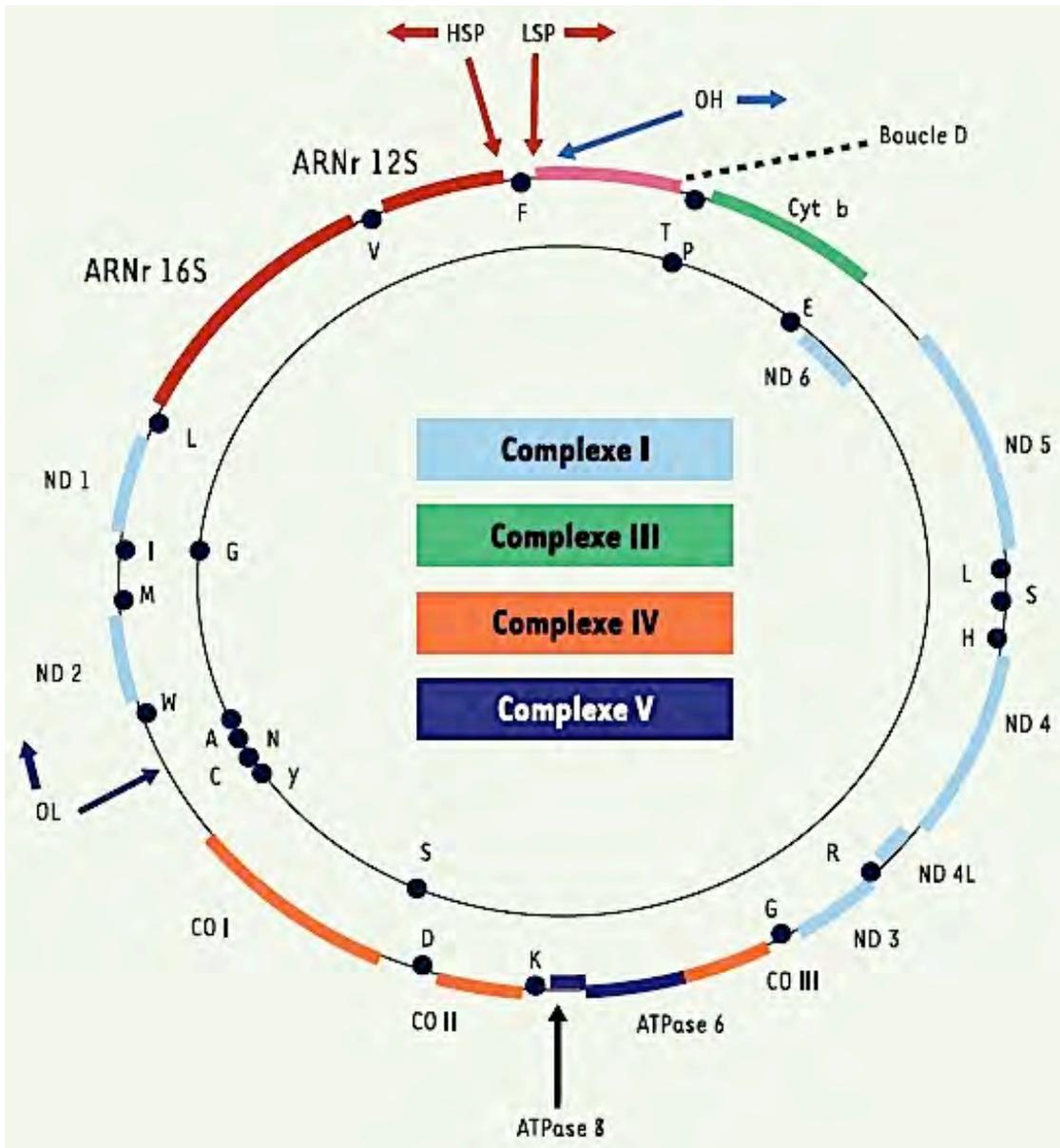
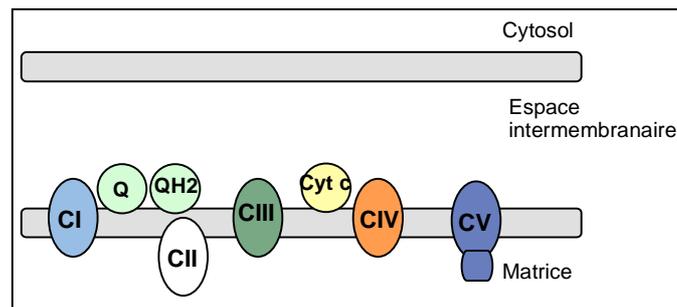
#### I-1- Généralités

Les mitochondries (« mitos » : fil, « chondros » : grain) ont été décrites pour la première fois par le médecin suisse Kölliker en 1858 dans des cellules musculaires. C'est le cytologiste Allman en 1890, grâce à la mise au point de techniques de coloration, qui visualise ces organites dans toutes les cellules à l'exception des érythrocytes. Dans les années 1940, le biochimiste belge Claude parvient à purifier des mitochondries d'hépatocytes grâce à la mise au point d'une technique de centrifugation différentielle.

##### I-1-1- Structure et composition

Les premiers clichés de microscopie électronique, obtenus dans les années 1950, ont permis d'établir le modèle de Palade qui décrit les mitochondries comme des organelles possédant une membrane externe, qui sépare l'organelle du cytosol, et une membrane interne délimitant l'espace intermembranaire et la matrice (Palade 1953) (Illustration 1). Ce modèle décrit les crêtes mitochondriales comme des saccules formés d'invaginations de la membrane interne à l'intérieur de la matrice et s'ouvrant sur toute la longueur de leur base au niveau de la membrane externe. La tomographie électronique a permis d'affiner ce modèle en montrant que les crêtes mitochondriales se rattachent à la membrane interne par des structures tubulaires étroites appelées jonctions de crêtes dont le diamètre n'excède pas 50nm (Mannella, 2006). Ces jonctions constituent une barrière de diffusion membranaire entre la membrane interne des crêtes et la membrane interne sous-jacente à la membrane externe qui limiterait la diffusion de composés entre l'espace intermembranaire intra-crêtes et celui sous-jacent à la membrane externe (Illustration 1). Les crêtes mitochondriales sont donc considérées comme un compartiment supplémentaire du fait de leur structure mais également de leur composition lipidique et protéique particulière. À titre d'exemples, citons les complexes de la chaîne respiratoire et les cardiolipides, phospholipides spécifiques de la mitochondrie, respectivement localisés ou accumulés au niveau des crêtes mitochondriales (Kagan et al., 2006).

La théorie endosymbiotique émise par Margulis en 1981 (Margulis, 1981) selon laquelle les mitochondries auraient pour origine l'endosymbiose d'une  $\alpha$ -protéobactérie et d'un eucaryote primitif, permet de mettre en évidence des analogies biochimiques et

**A****B**

**Illustration 2: Organisation de l'ADN mitochondrial humain (tiré de Panloup et al., 2004)**

**A:** La carte indique les différents gènes codés par le génome mitochondrial humain. Le génome mitochondrial contient des gènes codant pour 2 ARN ribosomiques (12S et 16S), 22 ARN de transfert et 13 gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire, illustrées dans l'encart **B**. ND: NADH-déshydrogénase; Cytb: cytochrome b (ubiquinone-cytochrome c-réductase); CO: cytochrome c-oxydase; ATPase: ATP-synthase. La boucle D permet le contrôle de la réplication et de la transcription. Cette région possède deux promoteurs de transcription (HSP et LSP) et une origine de réplication (OH).

généétiques entre les mitochondries et les bactéries. Citons comme exemples, la richesse des membranes en cardiolipides et leur génome circulaire. Ce génome mitochondrial autrefois bactérien a subi au cours de l'évolution des modifications conduisant à une perte et/ou un transfert d'une grande partie de l'information vers le noyau (Gabaldon and Huynen, 2004). Les protéines mitochondriales sont donc issues majoritairement de l'expression de gènes nucléaires et, pour à peine une dizaine, du génome mitochondrial qui code pour la machinerie de transcription/traduction mitochondriale et des complexes respiratoires.

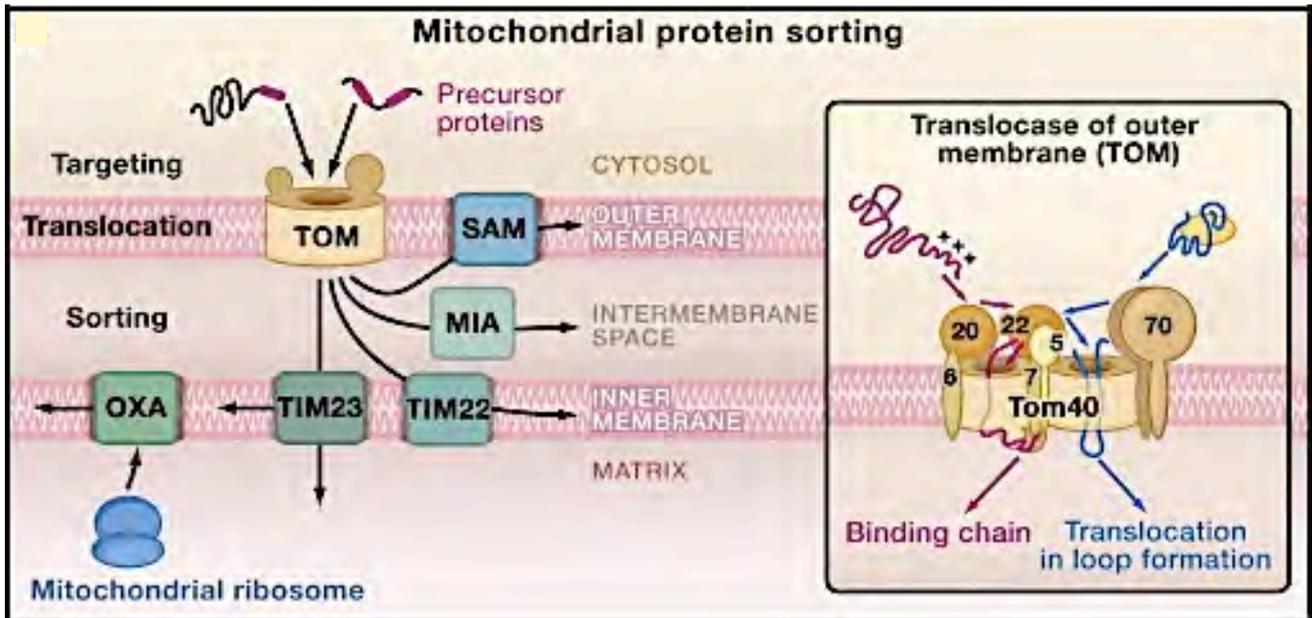
L'ADN mitochondrial humain de 17kb code pour 13 protéines, 2 ARN ribosomiques et 22 ARN de transfert. Les 13 protéines sont des composants des cinq complexes respiratoires : ND1 à 6 et ND4 pour le complexe I, le cytochrome b pour le complexe III, les cytochromes oxydases 1 à 3 pour le complexe IV et les sous-unités ATP6, 8 et 9 pour le complexe V (Illustration 2).

L'ADN mitochondrial (ADNmt) est localisé dans la matrice des mitochondries, au sein d'une structure nucléoprotéique, ou nucléoïde, dans laquelle il est notamment associé à ABF2, une protéine homologue fonctionnelle des histones, à des facteurs impliqués dans la transcription, sa réplication et sa réparation (Cheng and Ivessa, 2010; Garrido et al., 2003), ainsi qu'à des protéines permettant également l'association de l'ADNmt à la membrane interne (Boesch et al., 2010; Stuart et al., 2005).

Les protéines mitochondriales d'origine nucléaire sont traduites dans le cytosol. Il existe plusieurs types d'import qui dépendent de la localisation mitochondriale de la protéine (Illustration 3) (Chacinska et al., 2009).

Les protéines matricielles possèdent le plus souvent en N-terminal, une séquence d'adressage à la mitochondrie. Le complexe protéique TOM (Translocase de la Membrane Externe) permet aux protéines mitochondriales le franchissement de la membrane externe. Ce complexe se compose de protéines récepteurs des précurseurs (TOM20, TOM70 et TOM22) et de protéines formant le canal nécessaire à la translocation (TOM5, TOM6, TOM7 et TOM40). Le passage des protéines de la membrane interne par le complexe TIM (Translocase de la Membrane Interne) nécessite un potentiel de membrane mitochondrial et de l'énergie sous forme d'ATP. Il est composé de TIM50 qui reconnaît les séquences de signal d'import, de TIM23 qui est le canal et TIM21 qui couple la machinerie d'import à la chaîne respiratoire. L'interaction des complexes TIM et TOM permet de faciliter le passage des protéines de la membrane externe vers la membrane interne. Le transfert des protéines matricielles est réalisé par le complexe PAM (Presequence Associated translocase Motor).

Les protéines de la membrane interne qui comportent 7 domaines transmembranaires, contiennent initialement une pré-séquence et sont importées à la matrice par les complexes TOM et TIM. Après le clivage de la pré-séquence, les protéines



**Illustration 3: Les voies d'import et d'adressage des protéines mitochondriales (tiré de Chacinska et al., 2009)**

Le schéma illustre le mécanisme de l'import des protéines codées par le génome nucléaire dans les différents compartiments mitochondriaux en fonction de la nature de leurs signaux d'adressage à la mitochondrie présidant à leur destination finale.

sont relocalisées à la membrane interne par la protéine Oxa1p. Les protéines ne possédant qu'un seul domaine transmembranaire, après passage au niveau des complexes TOM et TIM, sont transférées latéralement et intégrées à la membrane interne. Les protéines très hydrophobes comme les protéines « carrier », sont importées *via* le complexe TOM et sont interceptées par Tim9p, Tim10p et Tim 12p dans l'espace intermembranaire pour être finalement transférées au complexe TIM22 qui permet l'insertion des protéines grâce au potentiel de membrane mitochondrial (Chacinska et al., 2009).

Les protéines de la membrane externe ayant une conformation en tonneau  $\beta$ , telles que VDAC ou TOM 40, sont insérées dans la membrane externe par le complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery) ou TOB (Translocase of Outer membrane  $\beta$ -Barrel proteins). Les protéines de la membrane externe possédant un domaine transmembranaire sont directement insérées à la membrane grâce au complexe TOM.

Certaines protéines de l'espace intermembranaire sont adressées à la membrane interne et sont ensuite libérées dans l'espace intermembranaire par protéolyse. Les autres sont délivrées après leur passage à travers le complexe TOM et sont prises en charge par des chaperonnes qui assurent leur repliement (Chacinska et al., 2009).

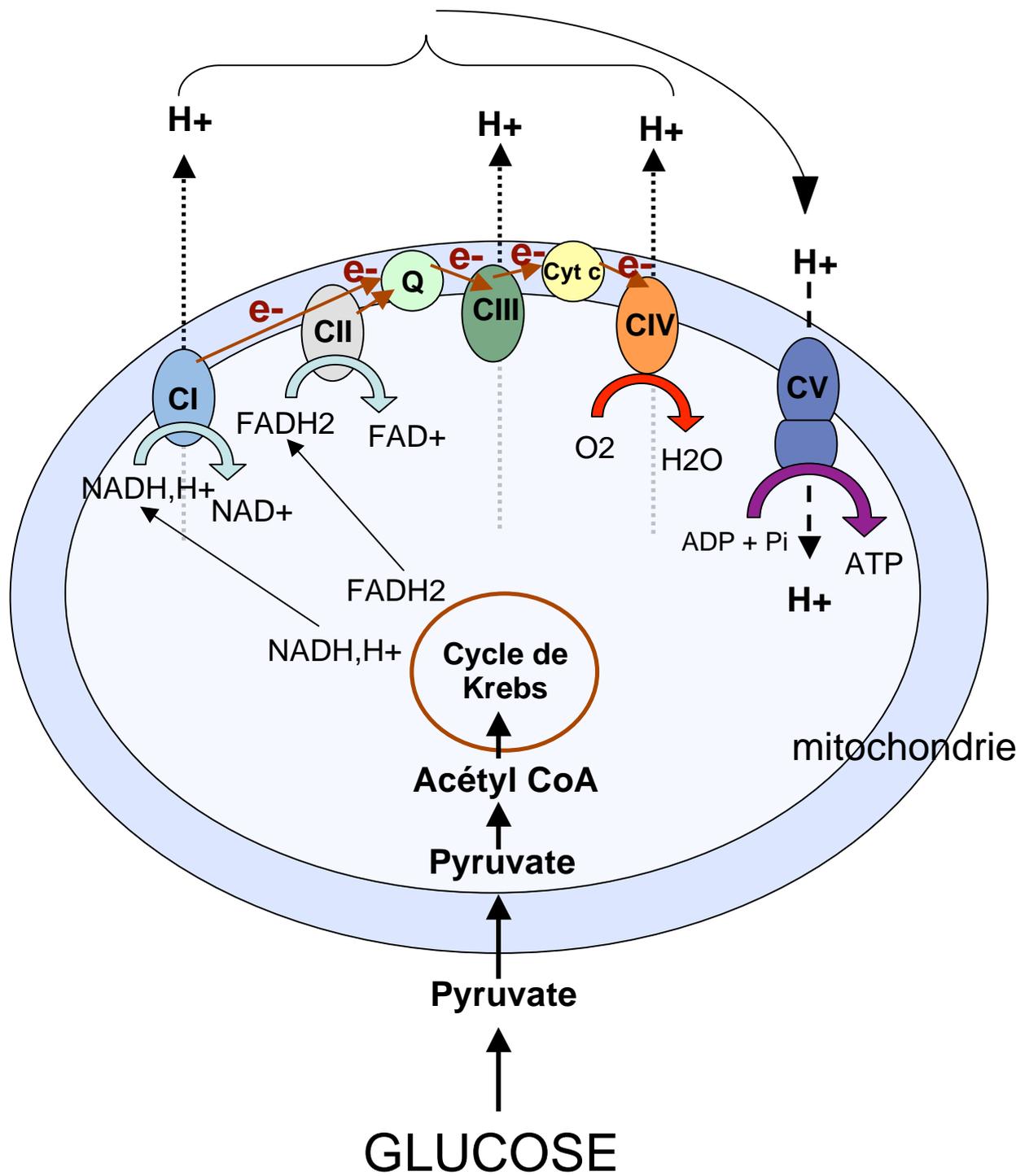
### I-1-2- Les fonctions mitochondriales

La mitochondrie occupe une place primordiale au sein du métabolisme énergétique cellulaire. Cet organelle, siège des oxydations phosphorylantes, intervient dans la ré-oxydation des intermédiaires réduits lors du catabolisme et permet la dégradation des lipides (Scheffler, 1999). Elle participe également dans des processus cellulaires clefs notamment l'apoptose, l'homéostasie calcique, le métabolisme des acides aminés, la synthèse lipidique et la production d'Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs).

#### I-1-2-1- Cycle de Krebs et phosphorylation oxydative

La mitochondrie est le siège du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative. Les réactions qui se déroulent au niveau du cycle de Krebs permettent de fournir les intermédiaires énergétiques à la chaîne respiratoire et à l'ATP synthase qui, par une série de phosphorylations oxydatives, vont assurer la production d'ATP (Illustration 4).

Le cycle de Krebs est une voie métabolique qui permet l'oxydation complète de l'Acétyl CoA et la libération d'énergie sous forme d'équivalents réduits, NADH, H<sup>+</sup> (Nicotinamide Adénine Dinucleotide) et le FADH<sub>2</sub> (Flavin Adénine Dinucleotide). Ces substrats vont céder leurs électrons à la chaîne respiratoire.



**Illustration 4: Schéma du fonctionnement mitochondrial**

Le pyruvate issu de la glycolyse pénètre dans la mitochondrie où il est transformé en Acétyl CoA, le substrat premier du cycle de Krebs. Ce cycle fournit les coenzymes réduits utilisés comme donneurs d'électrons à la chaîne respiratoire. La consommation d'oxygène par la chaîne respiratoire est couplée à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase: ce sont les oxydations phosphorylantes.

Cette chaîne de transport des électrons est constituée de quatre complexes protéiques I, II, III, et IV auxquels s'ajoutent des transporteurs mobiles : le Coenzyme Q (ubiquinone) et le cytochrome c. Les électrons libérés vont transiter au niveau des complexes de la chaîne respiratoire par une série de réactions d'oxydo-réduction et arrivent à l'accepteur final : l'oxygène moléculaire. Les réactions au niveau des complexes I, III et IV s'accompagnent du transfert de protons de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire qui établit une différence de potentiel de -150 à -180mV entre la membrane interne mitochondriale et le cytosol, à l'origine du potentiel de membrane mitochondrial (ou Delta Psi). Le gradient de concentration électrochimique crée une force, nommée force proton motrice, qui contraint les protons à revenir dans la matrice par le biais d'un canal à protons présent au sein de l'ATP synthase et qui est utilisée pour générer de l'ATP à partir d'ADP et de Pi (Gunter TE 2004, Mitchell P 1966).

### **Le complexe I**

Le complexe I (NADH Ubiquinone Oxidoreductase) constitué d'une quarantaine de sous-unités, reçoit les électrons et les protons du NADH, H<sup>+</sup> via une flavine mononucléotide (FMN). Sa forme réduite FMNH<sub>2</sub> permet le transfert des électrons aux centres Fe-S qui cèdent ensuite leur électron par ré-oxydation au Coenzyme Q. Cette réaction s'accompagne d'un transfert de 4 protons de l'intérieur de la matrice vers l'extérieur.

### **Le complexe II**

Le Complexe II (Succinate Dehydrogenase ou Succinate CoenzymeQ réductase) seul complexe à être totalement codé par le génome nucléaire, est composé de quatre protéines. Ce complexe permet la liaison directe de la chaîne respiratoire au cycle de Krebs. En effet, deux de ces protéines forment la portion périphérique du complexe et assurent la fonction de la succinate deshydrogénase. Elles sont associées à 2 autres protéines membranaires qui interagissent avec le cytochrome b et l'ubiquinone. Ce complexe reçoit les électrons libérés du FADH<sub>2</sub> qui sont transférés au Coenzyme Q par l'intermédiaire d'un centre Fe-S.

### **Le complexe III**

Le Complexe III (Coenzyme Q cytochrome C Réductase / Ubiquinol Cytochrome c Oxidoreductase) se compose de 11 sous-unités dont certaines possèdent le centre Fe-S et d'autres les cytochromes b<sub>562</sub>, b<sub>566</sub> et c<sub>1</sub>. Elles participent au transfert de 2 électrons au cytochrome c et à la translocation de 4 protons.



### **Le complexe IV**

Le complexe IV (Cytochrome c Oxydase) qui est constitué de 13 sous-unités possède entre autres deux cytochromes a et a<sub>3</sub> et différents ions métalliques notamment le cuivre. Ce complexe permet d'oxyder le cytochrome c réduit. Le cytochrome qui est une hémoprotéine soluble, va se déplacer sur la membrane interne pour transporter les électrons au complexe IV. Les centres Fer/Cuivre sont utilisés pour réduire la molécule d'oxygène, l'accepteur terminal d'électrons, en 2 molécules d'eau. Aux protons nécessaires à la réaction s'ajoutent 4 protons eux aussi pompés dans la matrice par le complexe et libérés dans l'espace intermembranaire.

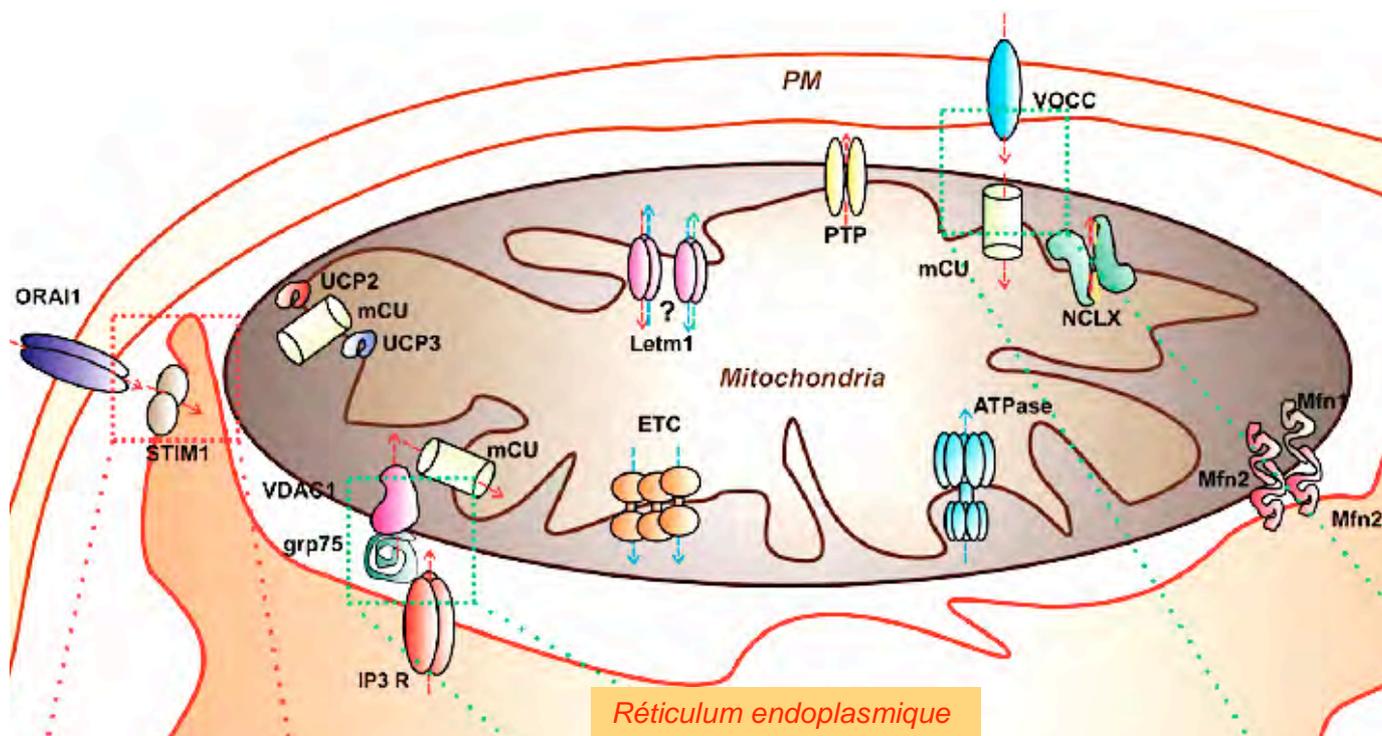
### **Le complexe V**

L'ATP synthase (ou complexe V), localisée dans la membrane interne mitochondriale, permet la phosphorylation de l'ADP en ATP. C'est une enzyme qui fonctionne de manière réversible puisqu'elle est capable de produire de l'ATP en utilisant la force proton motrice et d'hydrolyser l'ATP pour pomper les protons contre le gradient électrochimique. L'ATP synthase mitochondriale est composée de 2 domaines : le domaine membranaire F<sub>0</sub> formant le canal à protons et qui attache le domaine catalytique F<sub>1</sub> à la membrane interne. Le domaine F<sub>1</sub> est constitué de 5 polypeptides (sous-unités α, β, δ, γ, ε), les sous-unités a, b et c forment le domaine F<sub>0</sub> et les sous-unités a, b, α, β et δ composent le rotor dont la rotation transfère l'énergie du flux de protons à la production d'ATP. Ainsi, la force proton motrice dégagée lors du transport des protons par F<sub>0</sub> permet la rotation de la tête catalytique F<sub>1</sub> qui synthétise l'ATP.

### I-1-2-2- L'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire actif génétiquement programmé propre aux eucaryotes supérieurs, qui intervient également au cours du développement embryonnaire (Meier et al., 2000). Il existe deux voies distinctes de l'apoptose : la voie extrinsèque, aussi nommée la voie des récepteurs de mort, et la voie intrinsèque. La mitochondrie intervient dans l'apoptose par la voie intrinsèque dite mitochondriale. Cette voie consiste en la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale qui mène à la libération dans le cytosol de molécules situées initialement dans l'espace intermembranaire, capables d'initier et de réguler l'activation des caspases, des cystéines-protéases susceptibles de cliver plusieurs substrats essentiels pour la vie de la cellule (Wang and Youle, 2009).

Deux mécanismes de perméabilisation de la membrane externe sont proposés. Le premier consiste en l'ouverture d'un canal, le pore de transition de perméabilité (PTP) qui



**Illustration 5: Schéma de la gestion calcique mitochondriale (tiré de Contreras & Pozzan, 2010)**

Les flèches indiquent les flux d'ions. Les flèches rouges, Ca<sup>2+</sup> ; flèches bleues, H<sup>+</sup>; flèche jaune, Na<sup>+</sup>; flèche verte, K<sup>+</sup>. ETC, la chaîne de transport des électrons.

La figure représente les différents pores mitochondriaux : les pores mCU et Letm1 permettent l'entrée du calcium dans la mitochondrie et les pores NCLX, VDAC, PTP et Letm1 permettent la sortie de calcium.

La mitochondrie forme des microdomaines avec le RE qui sont solidarisés par des interactions entre MFN2 localisée au RE et MFN1/MFN2 de la mitochondrie. Les autres canaux sont décrits dans le texte.

permet la dilatation de la matrice et la rupture de la membrane externe. Le second implique la formation d'un pore au niveau de la membrane externe par deux membres pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2, Bax et Bak (Antignani and Youle, 2007; Grimm and Brdiczka, 2007). Bax constitutivement localisée à la mitochondrie oligomérisée avec Bax dont l'activation préalable permet sa translocation et son insertion au niveau de la membrane externe (Billen et al., 2008; Hsu et al., 1997; Wei et al., 2000).

La création de ces pores conduit à la libération de différents facteurs pro-apoptotiques dont le cytochrome c, Smac-Diablo, l'AIF, l'endoG. Le cytochrome c libéré s'associe avec du dATP et Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor 1) pour participer à la formation de l'apoptosome, un complexe multiprotéique initiant l'activation de la caspase 9 (Riedl and Salvesen, 2007). Smac/Diablo (Second mitochondrial activator of caspases / Direct IAP binding protein of low PI) interagit dans le cytosol avec des inhibiteurs de caspases, les IAP (Inhibitors of Apoptosis Proteins) (Vaux and Silke, 2003). AIF (Apoptosis Inducing Factor) une fois libéré, est transloqué au noyau pour participer à la condensation et à la fragmentation de la chromatine (Susin et al., 1999; Susin et al., 1996). L'endonucléase G est transloquée au noyau où elle induit la fragmentation de l'ADN indépendamment des caspases (Li et al., 2001; van Loo et al., 2001).

### I-1-2-3- Le calcium

Les fluctuations de la concentration en calcium intracellulaire sont perçues par les cellules en fonction de l'amplitude de la variation calcique, de sa fréquence et de sa durée. La cellule possède donc des systèmes de gestion de l'homéostasie calcique faisant intervenir des phénomènes d'extrusion et de séquestration du calcium ainsi que des canaux au niveau de la membrane plasmique, du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie (Kann and Kovacs, 2007).

L'accumulation du calcium dans la matrice mitochondriale est permise grâce au canal uniport mCU (mitochondrial Calcium Uniporter) (Illustration 5). La nature moléculaire de ce canal situé à la membrane interne mitochondriale vient seulement d'être découverte 50 ans après la mise en évidence de son existence (Baughman et al., 2011; Kirichok et al., 2004). Letm1, une autre protéine de la membrane interne, jouerait un rôle d'antiport  $\text{Ca}^{2+}$  / H (Jiang et al., 2009).

L'entrée du calcium du cytosol vers la mitochondrie nécessite un potentiel de membrane mitochondrial élevé (Thayer and Miller, 1990). En effet, la captation du calcium, comme son extrusion, sont des mécanismes électrogéniques. La dissipation du  $\Delta\psi$  notamment par un agent découplant empêche l'influx calcique mitochondrial. Le calcium localisé dans la matrice mitochondriale, régule les fonctions mitochondriales en participant à

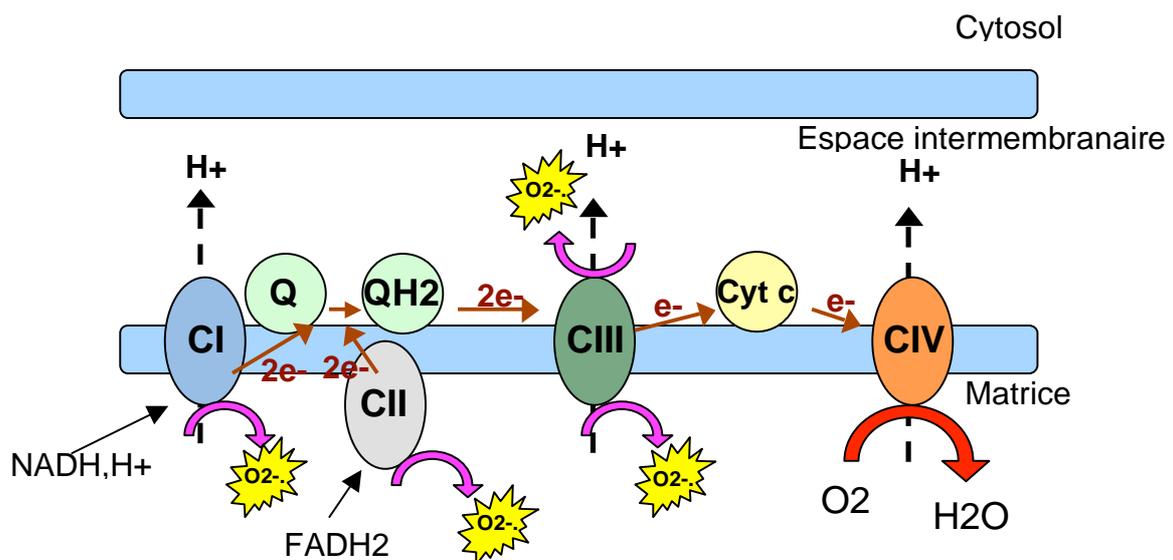


la production d'ATP, au contrôle redox et à l'apoptose (Brookes et al., 2004). Des élévations de concentration calcique mitochondriale stimule l'activité des déshydrogénases du cycle de Krebs et celles des complexes IV et V de la chaîne respiratoire (Denton and McCormack, 1980; Hansford et al., 1989; Territo et al., 2000).

La sortie du calcium de la mitochondrie se fait probablement par l'antiport  $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^{+}$  NCLX/NCX (Jung et al., 1995; Palty et al., 2010) et par le pore de transition membranaire (PTP ou mégacanal) dont l'ouverture est réalisée dans des conditions apoptotiques (Halestrap and Pasdois, 2009; Ichas et al., 1997; Rasola and Bernardi, 2007; Zoratti and Szabo, 1995).

Les influx calciques sont visibles pour des concentrations cytosoliques comprises entre 150 et 300 nM (Pitter et al., 2002). La cellule possède des systèmes pour accéder à ces grandes concentrations. En effet, il existe des microdomaines permettant de concentrer et de rendre plus rapides les flux ioniques notamment entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (Gerencser and Adam-Vizi, 2005; Hoth et al., 2000; Hoth et al., 1997; Malli et al., 2003; Pacher et al., 2002; Rizzuto and Pozzan, 2006). Ces appositions seraient possibles grâce à des interactions entre protéines retrouvées dans un ou plusieurs des compartiments. Ainsi, la protéine mitochondriale VDAC, un canal anionique potentiel-dépendant situé dans la membrane externe mitochondriale qui intervient dans la régulation de l'entrée calcique dans l'espace intermembranaire, interagit avec le réticulum endoplasmique par son association avec le canal le récepteur IP3R (inositol-1,4,5-triphosphate Receptor) qui permet la libération du calcium stocké dans le réticulum endoplasmique (Szabadkai et al., 2006). L'étroite communication entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie a également été révélée par la mise en évidence de la formation de points de contact entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie grâce à la protéine MFN2 découverte pour son rôle dans le contrôle de la forme des mitochondries (voir chapitre sur la dynamique mitochondriale). Les mitochondries interagissent également avec la membrane plasmique en particulier par le canal CRAC composé notamment de la protéine Orai1, qui module la voie d'entrée capacitative du calcium (Prakriya et al., 2006), mécanisme d'entrée ubiquitaire du calcium au travers de la membrane plasmique qui participe au remplissage des stocks calciques du réticulum endoplasmique (Putney, 1986, 1990).

Des élévations pathologiques de calcium cytosolique peuvent entraîner une accumulation calcique mitochondriale trop importante et provoquer l'ouverture du PTP et ainsi mener à la libération du cytochrome c (Bernardi and Petronilli, 1996; Szabo et al., 1992).



**Illustration 6: Sites de production des EAOs mitochondriales**

Les complexes I et II réduisent le coenzyme Q par l'intermédiaire des donneurs d'électrons NADH,H+ et le FADH2. Le coenzyme Q transfère ensuite les électrons au complexe III qui lui-même les conduit au Cytochrome c. Le complexe IV réduit l'oxygène en eau à partir des électrons provenant du Cytochrome c. Les complexes I, II et III produisent l'anion superoxyde à travers une réduction incomplète de l'oxygène. Alors que l'anion superoxyde produit par le complexe III diffuse dans la matrice et l'espace intermembranaire, les complexes I et II le produisent dans la matrice.

## I-1-2-4- Les Espèce Actives de l'Oxygène

### I-1-2-4-1- Production

La mitochondrie est le site majeur de production cellulaire des Espèces Actives de l'Oxygène (EAOs). Les EAOs peuvent être des radicaux libres, espèces chimiques qui portent un électron célibataire sur leur couche externe ou des molécules comme l'anion superoxyde ou l'oxyde nitrique. Les radicaux libres généralement instables, réagissent avec d'autres molécules, ce qui peut conduire à la formation d'un nouveau radical qui peut à son tour se propager par des réactions en chaîne.

Une faible proportion, 2 à 6%, de l'oxygène n'est pas totalement transformé par la mitochondrie en molécules d'eau donnant lieu à une réduction monoélectrique de l'O<sub>2</sub> en anion superoxyde (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) (Droge, 2002; Turrens, 1997, 2003). L'anion superoxyde est peu réactif, peu diffusible et a une demi-vie très courte. Il est néanmoins le précurseur d'autres EAOs comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

Deux sites principaux sont responsables de la production mitochondriale des EAOs : le complexe I et le complexe III de la chaîne respiratoire. La part respective de chacun des complexes dépendrait du type cellulaire et des conditions expérimentales (Barja, 1999) (Illustration 6).

La production de l'anion superoxyde au niveau du complexe I serait due à l'addition directe d'un électron à l'oxygène par l'un des 7 centres Fe-S qui composent ce complexe ou de manière indirecte à la réduction de quinones externes. Ces quinones alors sous la forme semiquinone sont très instables et peuvent réduire l'oxygène en O<sub>2</sub><sup>•-</sup>. Le groupement FMN serait également capable de générer l'anion superoxyde (Liu et al., 2002).

Le complexe I, qui contrôle majoritairement la respiration et la production d'ATP dans le cerveau, est considéré comme un site majeur de la production des EAOs (Robinson, 1998; Schapira, 1998). C'est le complexe respiratoire I qui contrôle majoritairement la respiration et la production d'ATP dans le cerveau (Davey et al., 1998). De plus, nombreuses sont les maladies neurodégénératives qui présentent un défaut de phosphorylation oxydative lié au complexe I; ce qui entraîne la mort neuronale par une production trop importante des EAOs et une diminution de la respiration dans les cerveaux de patients (Schapira, 1998). En outre, des mutations de ce complexe sont responsables d'altérations du développement cérébral (Smeitink et al., 2001) et sont impliquées dans des encéphalopathies (Benit et al., 2003; Nishioka et al., 2010).



Le complexe III est responsable de la production d' $O_2^{\cdot-}$  par l'intermédiaire du coenzyme Q sous sa forme ubiquinone dans le tissu cardiaque de rat (Turrens et al., 1985).

Certains travaux ont récemment révélé que des EAOs pouvaient également être générées à partir du complexe II. C'est le cas chez les plantes (Gleason et al., 2011) ou lors de la formation de tumeurs de manière contrôlée par le facteur HIF-1alpha (Guzy et al., 2008).

Même si la mitochondrie est la source majoritaire de la production des EAOs, d'autres processus faisant appel à l'oxygène peuvent mener à leur formation.

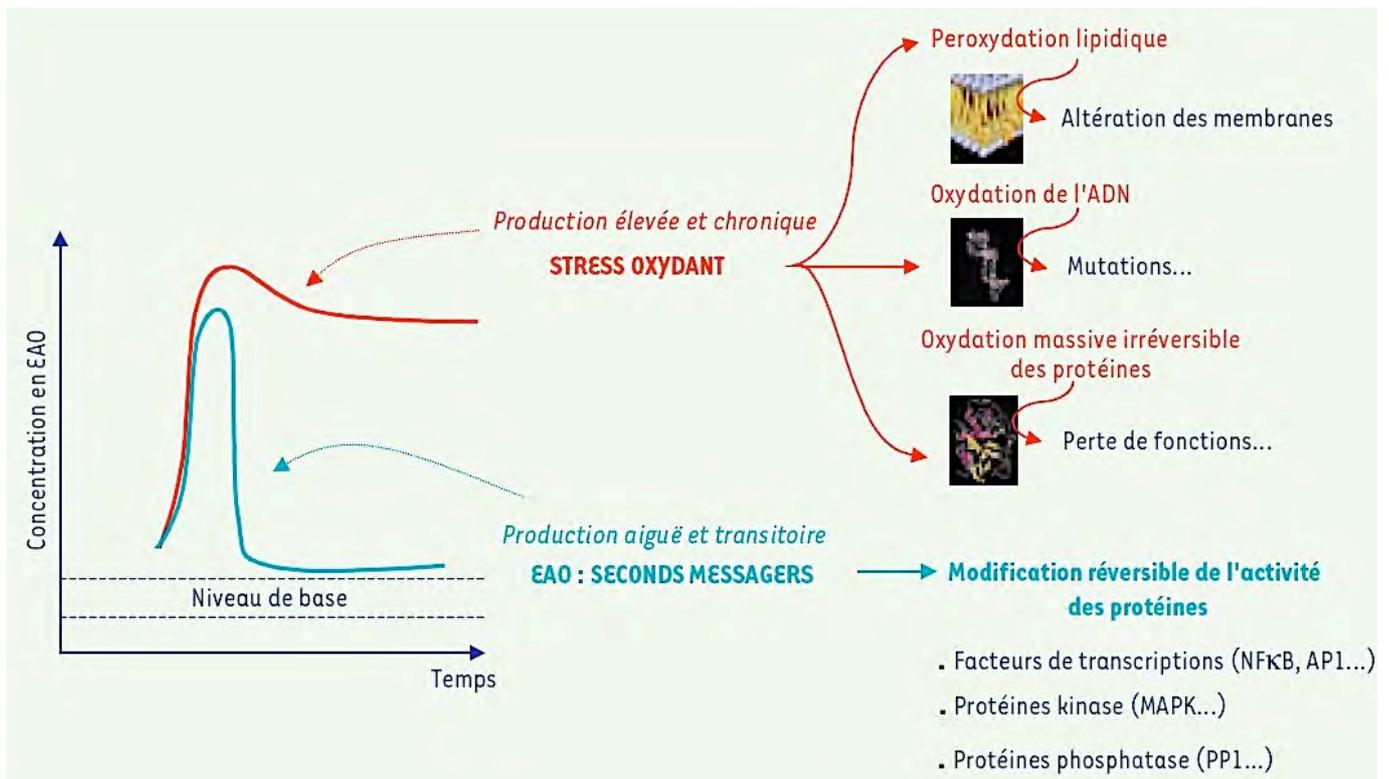
Les NADP(H) oxydases, ou NOX, sont des enzymes membranaires qui produisent l'anion superoxyde à partir de deux molécules d'oxygène et d'un équivalent réduit le NADPH. Des isoformes phagocytaires qui interviennent dans les processus d'inflammation font l'objet d'une abondante littérature. La NADPH oxydase neuronale contribue à la signalisation neuronale, à la mise en place de processus mnésiques ainsi qu'à la formation des neurites induite par le facteur de croissance NGF (Brennan et al., 2009; Ibi et al., 2006; Tejada-Simon et al., 2005). Certaines isoformes ont été impliquées dans les maladies neurodégénératives.

Les cytochromes P-450 monooxygénases localisées dans le réticulum endoplasmique participent à la détoxification de molécules xénobiotiques (pesticides, polluants, anesthésiques). Les substrats difficilement oxydables par le cytochrome P-450 entraînent la production d'anion superoxyde (Cross and Jones, 1991).

Les oxydases produisent, à partir de l'oxygène moléculaire, l'anion superoxyde lors de réactions cataboliques. Les oxydases se situent principalement dans les péroxysomes (péroxydases), dans le cytosol (xantine oxydase) et à la membrane externe des mitochondries (monoamines oxydases). Ces dernières sont impliquées dans le catabolisme des monoamines (dopamine, noradrénaline, autres). La lipoxygénase et la cyclooxygénase qui synthétisent les eïcosanoïdes à partir de l'acide arachidonique, produisent également des EAOs.

#### I-1-2-4-2- Mécanismes de détoxification

Afin d'éviter la mise en place d'un stress oxydant, la cellule est dotée d'un système de gestion des EAOs qui limite leur concentration. Il existe différents anti-oxydants de nature variable, qui agissent soit en inhibant la formation des EAOs, soit en les piégeant, en les métabolisant ou encore en réparant les dommages oxydatifs occasionnés.



**Illustration 7: Les deux modes d'altérations cellulaires dus à une élévation de la concentration d'EOs aigüe ou chronique (tiré de Carrière & Casteilla, 2006).**

Lorsque la production d'EOs est modérée et peu étendue dans le temps, les EOs modifient de manière spécifique et réversible des cibles qui jouent un rôle dans la signalisation redox. Quand cette production devient chronique, les modifications deviennent alors aspécifiques et irréversibles. On parle de stress oxydant qui aboutit à des situations d'oxydation physiopathologiques.

Différentes enzymes interviennent dans la dégradation des EAOs.

Les superoxydes dismutases (SOD) permettent la dismutation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène et en oxygène. Il existe chez l'homme trois isoformes protéiques de la SOD. La SOD1 est principalement localisée dans le cytosol et pour une faible fraction dans l'espace intermembranaire. La SOD3 est une isoforme extracellulaire particulièrement retrouvée dans les fluides extracellulaires (Mates and Sanchez-Jimenez, 1999). Les SOD1 et 3 ont des activités cuivre / zinc dépendantes. La SOD2 (manganèse dépendante) est localisée dans la matrice mitochondriale. L' $H_2O_2$  découlant de l'activité SOD est ensuite décomposée par la catalase située dans les péroxysomes et la matrice mitochondriale, en  $H_2O$  et en  $O_2$ . Les enzymes glutathion peroxydases (GPx) décomposent l' $H_2O_2$  et les hydroperoxydes ROOH en eau et en alcool respectivement et nécessitent la présence de glutathion réduit. Il existe plusieurs isoformes protéiques des GPx (GPx1 à 4) qui sont localisées dans les compartiments cytosolique, mitochondrial, membranaire et extracellulaire.

La détoxification des EAOs est également réalisée grâce à des « piègeurs » qui, sous leur forme réduite, sont capables de piéger les EAOs. Ces molécules peuvent provenir de l'alimentation comme les vitamines C et E ou les caroténoïdes mais, peuvent également être synthétisées par l'organisme (glutathion, coenzyme Q). Le glutathion et la thiorédoxine sont capables de réduire les résidus cystéines oxydés par les EAOs. Ces « donneurs de  $-SH$  » sont régénérés en permanence par la glutathion réductase et la thiorédoxine réductase. La détoxification des EAOs peut également passer par l'utilisation de molécules « ARE-inducers » qui activent la translocation de facteurs de transcription qui vont induire des enzymes de détoxification (Hu et al., 2010).

#### I-1-2-4-3- Homéostasie redox et stress oxydant

L'homéostasie redox résulte de la balance entre les systèmes producteurs des EAOs et les systèmes antioxydants. Les différents antioxydants présents dans la cellule, constituent un système de gestion des EAOs qui permet de limiter leur concentration et d'éviter la mise en place d'un stress oxydant. On parle de signalisation redox lors d'un déséquilibre modéré au cours duquel la production élevée d'EAOs peut déclencher des systèmes d'adaptation de la cellule afin de maintenir la balance comme par une réponse antioxydante. Par contre, lorsque les systèmes de gestion des EAOs sont dépassés (excès de production des EAOs et/ou diminution des systèmes antioxydants), on parle de stress oxydant (Illustration 7).



Un paramètre largement utilisé pour caractériser l'état redox d'une cellule consiste à mesurer le rapport des formes réduites et oxydées du glutathion. Le glutathion joue en effet, à travers son implication dans les défenses antioxydantes, un rôle central dans le contrôle de l'homéostasie redox des cellules de mammifères (Droge, 2002). Lorsque la concentration des EAOs augmente, la glutathion peroxydase est sollicitée pour décomposer le peroxyde d'hydrogène par exemple. Le glutathion réduit GSH est alors consommé et devient oxydé GSSG. Si la vitesse de régénération du GSH (par la glutathion réductase) est inférieure à la réaction catalysée par la glutathion peroxydase, l'état redox du glutathion peut alors être modifié. Ainsi, plus la production des EAOs est élevée, plus la valeur du rapport GSH/GSSG est faible.

Lorsque les EAOs produits modifient réversiblement des sites spécifiques sur des molécules environnantes, celles-ci peuvent agir en tant que molécules « signals » : il s'agit de la signalisation redox. La plupart des modifications des protéines correspondent à une oxydation de la cystéine au niveau de son groupement thiol. Un environnement oxydant lié à la présence d'EAOs ( $O_2^-$  et  $H_2O_2$ ) induit la formation de ponts disulfures (-S-S-) au niveau des cystéines, de manière réversible en conditions physiologiques. Ainsi, lorsque le système est bien géré, la signalisation redox et la réponse anti-oxydante qui lui fait suite permet un retour rapide à l'état redox initial.

En revanche, lorsque les systèmes de gestion des EAOs sont dépassés, soit par un excès d'EAOs produits, soit par une diminution des systèmes antioxydants, on parle de stress oxydant. Ce dernier résulte d'un niveau très élevé des EAOs qui persiste dans le temps. Les modifications des molécules environnantes sont, cette fois-ci, irréversibles et non spécifiques (Droge, 2002). Les protéines sont sujettes à une oxydation massive de divers acides aminés, dont principalement au niveau des groupements sulfhydryles (-SH) de la cystéine qui conduit à la formation des ponts disulfures. Des modifications irréversibles et non spécifiques provoquent aussi la dégradation des acides gras polyinsaturés (péroxydation lipidique) (Roberts and Morrow, 2000). Des dommages à l'ADN par l'oxydation des bases azotées de l'ADN, principalement au niveau de la guanine qui une fois oxydée donne la 8-hydroxy-2'-desoxyguanosine, sont également rencontrées (Helbock et al., 1999).

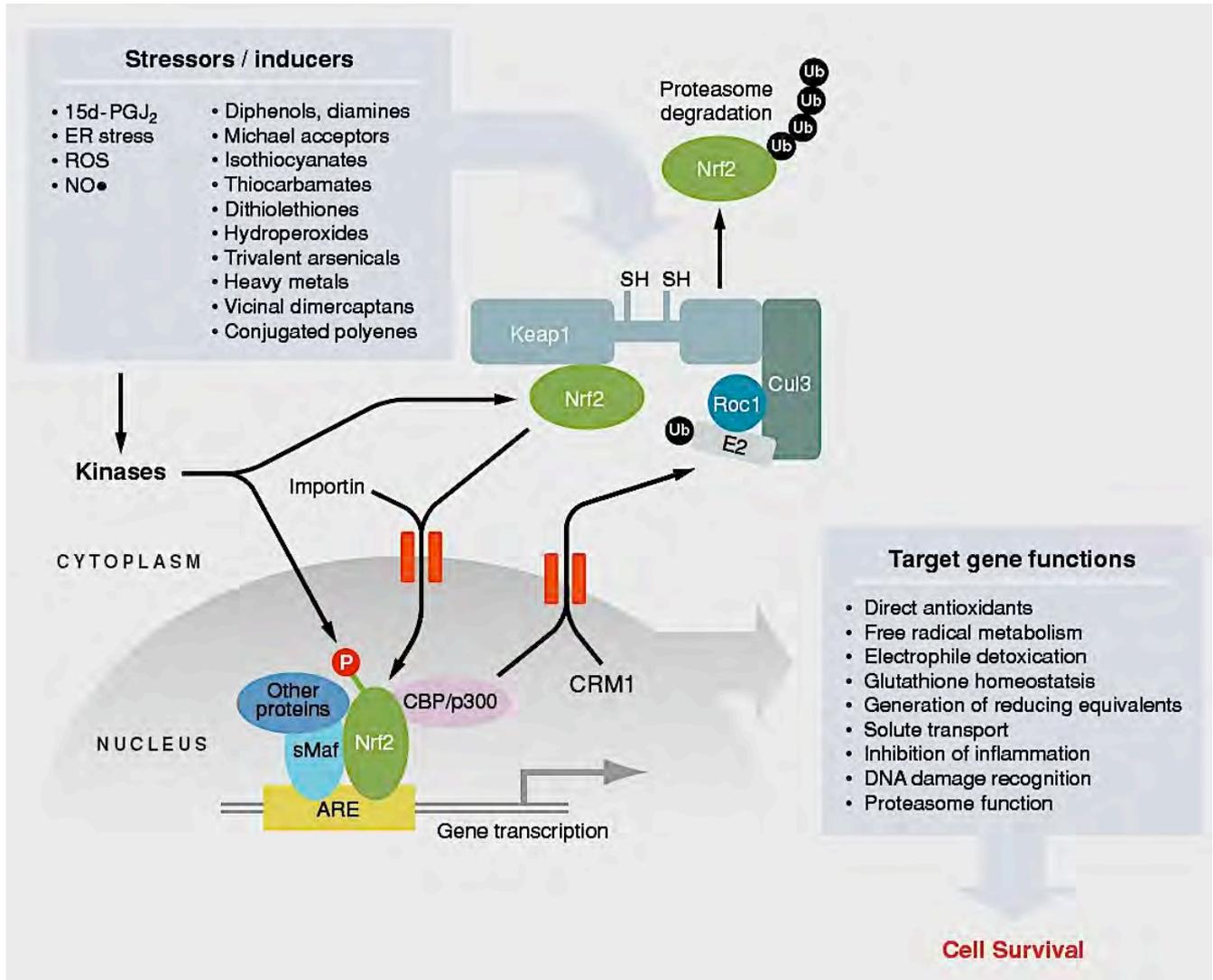
Les dommages oxydatifs sur les principales macro-molécules de la cellule vont alors contribuer à de nombreuses situations physiopathologiques dont les maladies neurodégénératives (voir discussion en partie II) (Droge, 2002).



#### I-1-2-4-4- La signalisation EAOs

Quand leur production est contrôlée, les EAOs peuvent agir comme de véritables seconds messagers. En effet, ils influencent l'activité de protéines impliquées dans différentes voies de signalisations notamment celles intervenant dans la régulation du métabolisme, dans les processus de prolifération ou de différenciation cellulaire. La plupart des cibles protéiques sont modifiées par l'oxydation réversible de résidus cystéine localisés à des endroits de la protéine importants pour son activité, comme au sein de domaines catalytiques (Morel and Barouki, 1999). L'oxydation de domaines d'interaction peut également influencer la liaison des protéines oxydées à leurs partenaires et, pour certaines, modifier leur localisation cellulaire. Citons comme exemples : les MAPK (Mitogen Activated Protein Kinases) intervenant dans la signalisation intracellulaire dont l'activité catalytique est stimulée par le peroxyde d'hydrogène qui entraîne une phosphorylation massive des résidus tyrosine (Guyton et al., 1996); les tyrosines phosphatases inactivées par oxydation de cystéines localisées dans le site catalytique (Barrett et al., 1999; Denu and Tanner, 1998); la protéine I $\kappa$ B dont l'oxydation et la dégradation libère le facteur de transcription NF $\kappa$ B qui peut alors rejoindre le noyau (Manna et al., 1998; Schulze-Osthoff et al., 1995); le facteur de transcription p53, un suppresseur de tumeur, qui une fois oxydé ne peut plus lier l'ADN (Morel and Barouki, 1999). Ce type de régulation est rapide, réversible et permet une adaptation suivant l'état redox de la cellule.

La production d'EAOs transmet les signaux de divers stimuli physiologiques en servant de relais d'informations par la modification de cibles redox sensibles. La production d'EAOs intervient dans la signalisation de nombreux facteurs de croissance, hormones et cytokines mais est également médiatrice des effets de l'hypoxie. En effet, la production d'EAOs serait responsable de la stabilisation du facteur de transcription HIF (Hypoxia Inducible Factor) et permettrait l'induction de la transcription de gènes impliqués dans l'angiogenèse, la glycolyse et l'érythropoïèse (Wenger, 2002). Les EAOs participent de plus à la signalisation neuronale. En effet, les EAOs mitochondriales sont nécessaires pour la détection du glucose et des lipides au cours de la prise alimentaire au niveau de l'hypothalamus de rat (Benani et al., 2007; Leloup et al., 2006; Leloup et al., 2009). De même, au niveau du striatum de souris, le peroxyde d'hydrogène provenant des mitochondries permet de réduire la libération de la dopamine via l'oxydation des canaux K-ATP (Avshalumov et al., 2003; Avshalumov et al., 2008). Les EAOs sont nécessaires pour l'induction de la potentialisation à long terme, facilitent la signalisation calcique neuronale et contrôlent les communications neurone-glie dans l'hippocampe (Klann et al., 1998; Atkins and Sweatt, 1999; Yermolaieva et al., 2000).



**Illustration 8: Signalisation du facteur de transcription NRF2 (tiré de Kensler et al., 2007).**

Différents stress dont un stress oxydatif induisent une perturbation de l'association de NRF2 avec Keap1. Ceci mène à une inhibition de la protéolyse de NRF2. Après une phosphorylation de NRF2 par une série de kinases, NRF2 est transloquée au noyau. NRF2 vient se lier aux séquences ARE en s'associant à d'autres facteurs avec qui NRF2 forme un complexe transcriptionnel permettant la transcription de gènes cibles : les gènes antioxydants, des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN ou dans le protéasome.

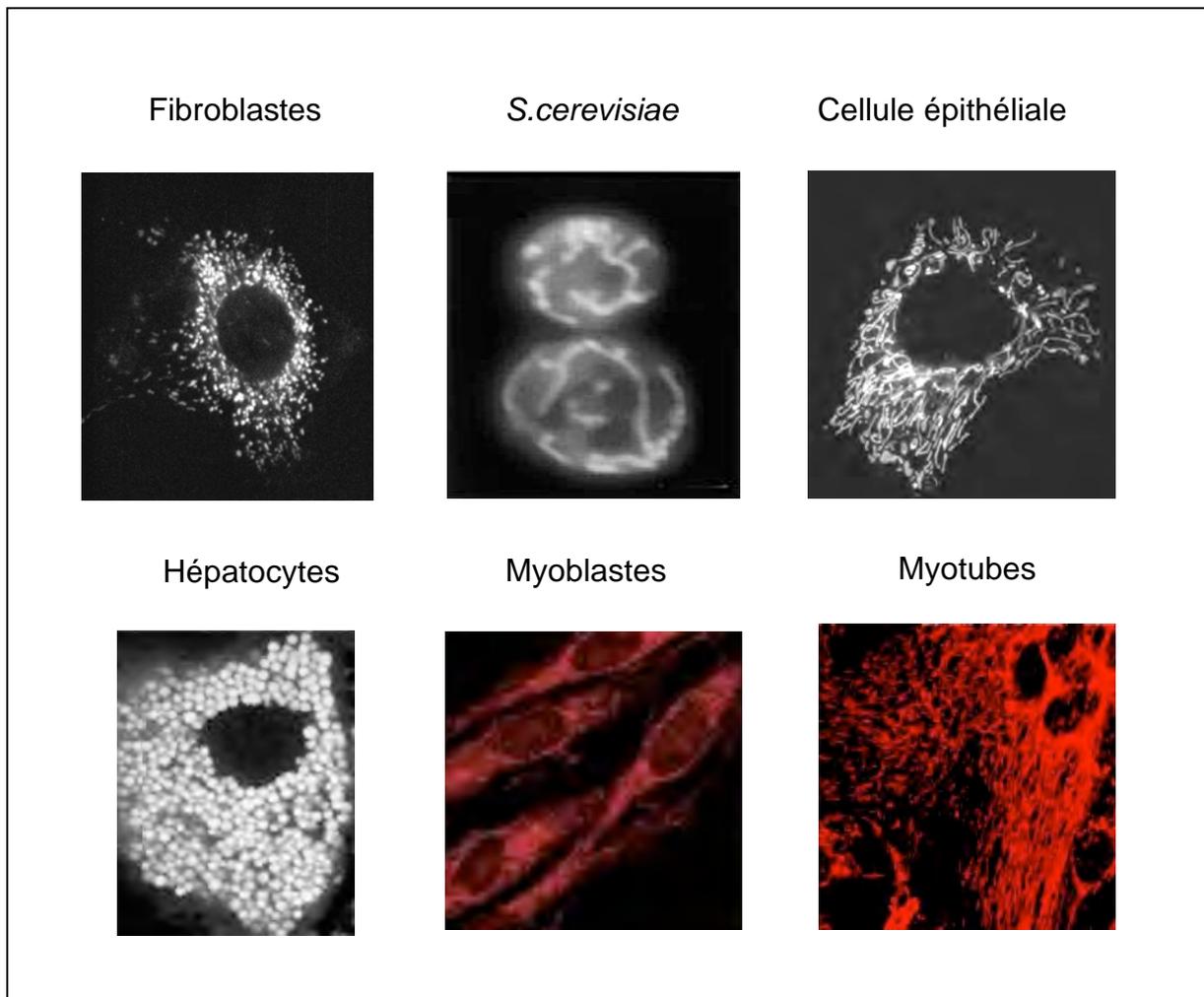
Ceci permet une réponse adaptative qui améliore la résistance des cellules aux stress environnementaux.

Le rôle physiologique des EAOs sur le devenir des cellules interviendrait d'une part sur la prolifération et d'autre part sur la différenciation cellulaire. Ce qui confère une importance particulière aux EAOs dans l'équilibre d'auto-renouvellement et de différenciation des cellules souches (Smith et al., 2000). Enfin, de par leur capacité à contrôler la prolifération cellulaire, les EAOs peuvent être impliquées dans la transformation oncogénique et le cancer. Dans de nombreux types cellulaires, de faibles concentrations d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> stimulent la prolifération (cellules musculaires lisses, fibroblastes, cellules endothéliales) ou la stoppent pour tendre vers un processus de différenciation (ostéoblastes, préadipocytes) (Burdon, 1995, 1996; Carriere et al., 2003). La différenciation cellulaire s'accompagne d'une élévation de l'état d'oxydation (Allen, 1991), comme décrit dans les cellules souches hématopoïétiques (Ito et al., 2004; Owusu-Ansah and Banerjee, 2009). De plus, la participation des EAOs à la spécification des cellules souches neurales a été démontrée. En effet, des changements de l'état redox intracellulaire de ces progéniteurs se produisent lors de leur différenciation (Kennedy, 2000; Prozorovski et al., 2008; Tsatmali et al., 2005). Ainsi, au cours de la différenciation neuronale induite par le NGF (Nerve Growth Factor), l'élévation du niveau des EAOs permet la mise en place de la neuritogenèse dans les cellules « neuron-like » PC12 (Suzukawa et al., 2000).

#### I-1-2-4-5- NRF2

Les EAOs sont impliqués dans des processus de signalisation cellulaire mais contribuent également à des situations pathologiques pouvant mener à la mort de la cellule. Cette dualité d'action, qui demande donc une régulation subtile, est parfaitement illustrée par NRF2 (Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2) qui orchestre la signalisation EAOs à la fois dans des conditions physiologiques et pathologiques (Illustration 8).

NRF2 est un facteur de transcription appartenant à une famille comportant NRF1, NRF2 et NRF3 dont la découverte est justement liée à son implication dans la mise en place d'une machinerie antioxydante lors d'un stress (Sykiotis and Bohmann, 2010). Lorsque la cellule est dans un état réduit, Keap1 (Kelch ECH associating protein 1) interagit avec NRF2 et le cytosquelette d'actine pour séquestrer NRF2 dans le cytosol (Itoh et al., 1999; Kang et al., 2004; Kensler et al., 2007). Cette interaction promeut la dégradation par ubiquitinylation de NRF2 (Itoh et al., 2003; Nguyen et al., 2003). Au contraire, dans un état oxydant très élevé, Keap1 est oxydé sur ses résidus cystéines et NRF2 est libéré. NRF2 transloque alors dans le noyau grâce à un signal de localisation nucléaire (NLS) et se fixe à l'ADN au niveau de séquences promotrices de type ARE (Antioxidant Responsive Element) en présence d'autres facteurs de transcription (Itoh et al., 1997; Jain et al., 2005). Les gènes cibles



**Illustration 9: Morphologie mitochondriale**

La morphologie des mitochondries varie en fonction du contexte, du type cellulaire et de l'organisme (tiré de Mannella et al., 2006).

codent entre autres pour des enzymes antioxydantes, des protéines participant au métabolisme des radicaux libres, des enzymes permettant la régénération du NADPH (glucose-6-phosphate, 6-phosphogluconate dehydrogénase) et des protéines importantes pour l'homéostasie du glutathion (Prester et al., 1995; Thimmulappa et al., 2002). Les premières études présentent NRF2 comme un agent neuroprotecteur en réponse à des stress carcinogènes ou lors de maladies neurodégénératives (Calkins et al., 2009).

Cependant, NRF2 participe également à différentes voies de signalisation dans des conditions physiologiques. En effet, NRF2 contrôle la prolifération des cellules souches intestinales dans un modèle de drosophile (Hochmuth et al., 2011) et participerait à la différenciation neuronale dans des lignées « neuron-like » SH-SY5Y et des cultures primaires de neurones corticaux (Zhao et al., 2009a). La surexpression ou la perte de NRF2 dans ces modèles cellulaires stimule ou retarde respectivement la croissance neuritique. De même, l'induction de la croissance neuritique de cellules de la lignée « neuron-like » PC12 par l'acide carnosique, un dérivé de prostaglandines, active la voie NRF2 via le complexe p62/ZIP qui intervient dans la croissance neuritique induite par le NGF (Kosaka et al., 2010). Les cibles transcriptionnelles neuronales par NRF2 restent à élucider.

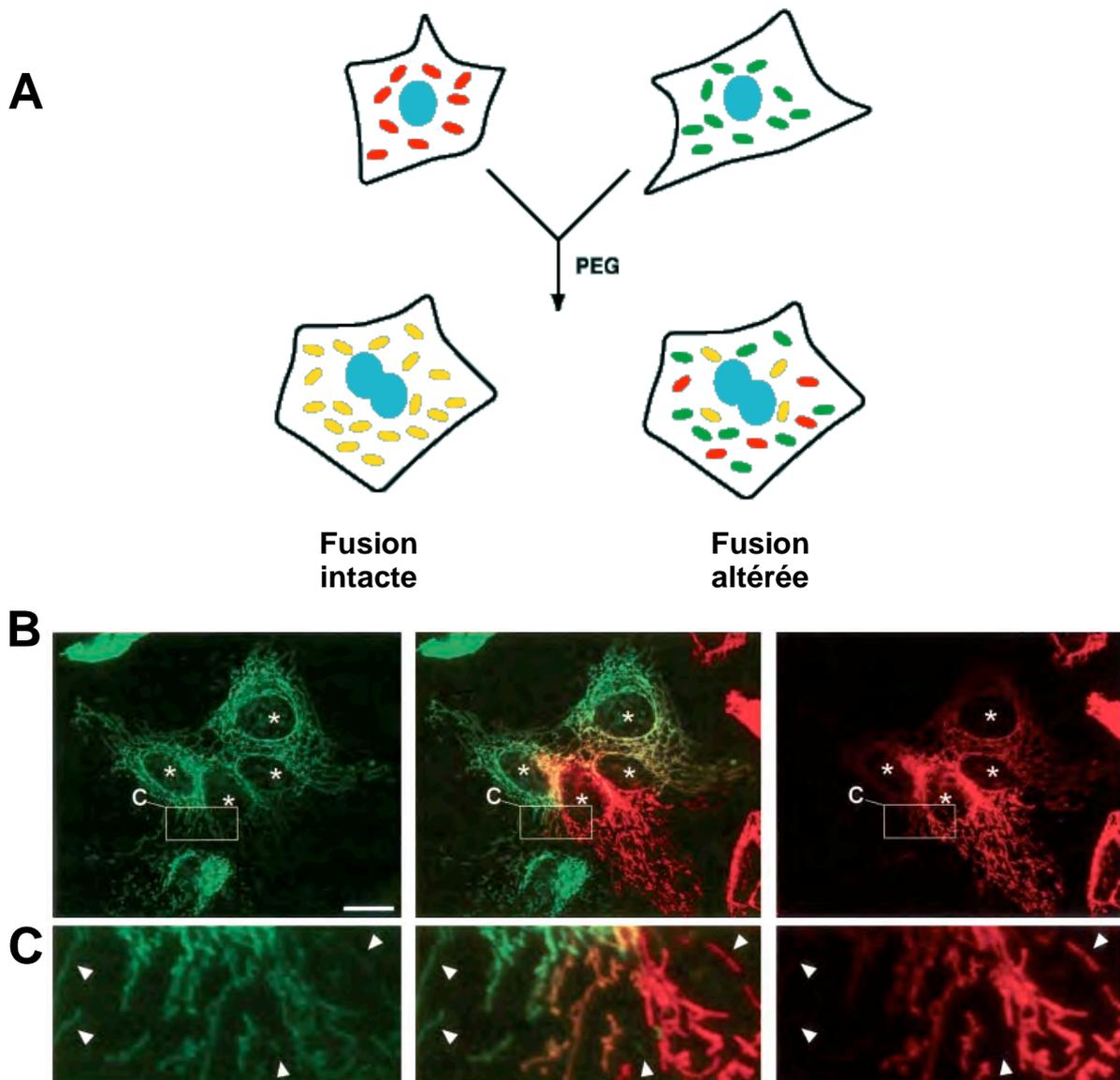
NRF2 apparaît donc comme un senseur clef de l'état redox de la cellule en permettant l'adaptation oxydative en conditions physiologiques, qui agit comme un agent neuroprotecteur influençant la sensibilité aux stress et la durée de vie.

## **I-2- La dynamique mitochondriale**

### I-2-1- Définition, caractéristiques, mesure

Il y a 100 ans déjà que la notion de morphologie et de distribution des mitochondries chez les cellules eucaryotes a été introduite par Lewis MR et Lewis WH en 1914. Préalablement, la découverte des mitochondries sous la forme de grains par R. Kölliker et de filaments en 1857 par R. Altmann, révélaient la variabilité morphologique de ces organelles (Illustration 9).

Les mitochondries adoptent en effet différentes formes suivant le type et le contexte cellulaires. Elles peuvent apparaître sous forme d'entités isolées (fibroblastes embryonnaires murins, hépatocytes) ou bien former un réseau de filaments plus ou moins longs et interconnectés (cellules HeLa, cardiomyocytes, *S.pombe* et *S.cerevisiae*) ou enfin présenter une morphologie mixte (ostéosarcome) (Collins et al., 2002; Guillou et al., 2005; Kuznetsov et al., 2009; Landes et al., 2010b; Margineantu et al., 2002).



**Illustration 10: Tests de fusion mitochondriale (tiré de Legros et al., 2002).**

**A:** Représentation schématique du test de fusion cellulaire au polyéthylène glycol (PEG).

**B:** Des cellules HeLa exprimant soit une GFP adressée à la mitochondrie, soit une RFP adressée à la mitochondrie ont été mélangées et fusionnées avec du PEG puis fixées après 2H et observées au microscope à fluorescence.

**C:** Élargissement des zones encadrées dans B. les astérisques indiquent la position des noyaux hétéro-polycaryons et les flèches indiquent la position des mitochondries exprimant un seul marqueur. La présence des mitochondries possédant un double marquage (jaune) montre l'échange des protéines fluorescentes matricielles par la fusion.

La morphologie des mitochondries est sous la dépendance d'une composante extrinsèque qui contrôle leur distribution et leur mobilité (voir chapitre III-2) et d'une composante intrinsèque, appelée la dynamique mitochondriale, qui correspond à des évènements de fusion et de fission des membranes de l'organelle. Lorsque les évènements de fission prédominent, le réseau mitochondrial apparaît fragmenté. À l'inverse, quand les évènements de fusion prédominent, les mitochondries forment un réseau tubulaire et interconnecté. Cet équilibre est dynamique. En effet, les mitochondries fissionnent et fusionnent en permanence quelles que soient leurs formes.

La morphologie est également modifiée pour un type cellulaire donné dans différentes situations de prolifération, de différenciation ou suivant les conditions environnantes comme le type de milieu nutritif. Ainsi, lors de la mitose, les mitochondries se fragmentent, ce qui permettrait une répartition équitable des organelles entre les deux cellules filles (Taguchi et al., 2007). De plus, chez la levure *S.cerevisiae*, les mitochondries se présentent sous forme de filaments en phase exponentielle, d'un réseau hyperfilamenteux en croissance respiratoire, et sous forme d'entités sphériques en phase stationnaire (Jakobs et al., 2003).

La seule observation de la morphologie des mitochondries dans les conditions de microscopie usuelles ne permet pas de rendre compte de l'activité de fusion et de fission mitochondriale. Pour évaluer cette activité, des techniques de mesure directe de la fusion des mitochondries ont été mises en place.

L'une d'elles permet d'étudier la fusion des mitochondries après fusion cellulaire artificielle chez les eucaryotes supérieurs (traitement au PEG ou PolyÉthylène Glycol) (Legros et al., 2002; Nunnari et al., 1997). Ce test consiste à mélanger et à fusionner par le PEG, deux lignées cellulaires dont les mitochondries sont préalablement marquées par deux fluorochromes différents. L'hétéropolycaryon en découlant possède des mitochondries de chacune des cellules qui sont redistribuées et qui fusionnent entre elles (Illustration 10).

Des tests quantitatifs de fusion chez les eucaryotes supérieurs ont vu le jour grâce au développement de protéines fluorescentes photoactivables (Karbowski et al., 2004a). Un variant photoactivable de la GFP adressé à la mitochondrie permet, suite à la photoactivation d'une région restreinte de la cellule, le suivi du taux de dilution de la fluorescence. Cette dilution est la conséquence de la transmission de la fluorescence à d'autres mitochondries voisines situées dans des zones non photo-activées. La fluorescence est diluée pour un temps donné seulement si les mitochondries fusionnent.



## I-2-2- Acteurs et mécanistique de la fission mitochondriale

### I-2-2-1- Les acteurs essentiels de la fission mitochondriale

Le premier acteur de la fission mitochondriale a été découvert chez la levure (Dnm1p) puis chez les eucaryotes supérieurs (DRP1). Ce fut ensuite le tour de Fis1p qui est conservée de la levure à l'homme (FIS1). Ces deux protéines sont impliquées dans le contrôle de la fission de la membrane externe.

#### **DNM1/DRP1/DLP1**

L'un des acteurs principaux de la fission est la dynamine Dnm1p (dynamamin related 1) chez la levure, DRP-1 chez *C.elegans* (Labrousse et al., 1999) et DRP1/Dlp1/DVLP/Dymple chez les mammifères (Pitts et al., 1999). Comme les dynamines classiques, DRP1 possède un domaine GTPase N-terminal, un domaine Middle et un domaine GED C-terminal (Praefcke and McMahon, 2004). Chez les mammifères, la perte de la protéine DRP1 ou la surexpression de mutants dominants négatifs mènent à une hyper-filamentation des mitochondries.

DRP1, majoritairement cytoplasmique, est recrutée de manière ponctuelle à la membrane externe mitochondriale lors d'un événement de fission, aux futurs sites de fissions (Labrousse et al., 1999; Smirnova et al., 2001). DRP1 est détectée ensuite à l'une ou l'autre des extrémités nouvellement formées (Smirnova et al., 2001). Alors que le recrutement de Dnm1p fait intervenir Fis1p, celui de DRP1 chez les mammifères est moins clair. Si des expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfert) montrent une interaction directe entre FIS1 et DRP1, le traitement de cellules par un siARN ciblant FIS1 n'empêche pas le recrutement de DRP1 à la membrane externe (Lee et al., 2004). Trois nouveaux acteurs de fission, Mff, MiD49 et MiD51 ont été récemment proposés comme responsables de l'ancrage de DRP1 à la membrane externe (voir plus loin). De plus, le cytosquelette de microtubules et le moteur rétrograde dynéine/dinactine permettent le recrutement de DRP1 en conditions basales (Varadi et al., 2004) alors que le cytosquelette d'actine est impliqué en conditions de fission induite par des inhibiteurs de la chaîne respiratoire (De Vos et al., 2005). Au cours de l'apoptose, DRP1 est recrutée à la mitochondrie grâce aux protéines p20-AP31 et DDP/TMM8a (Arnoult et al., 2005b; Karbowski et al., 2002). Très récemment, il a été mis en évidence que les sites de division des mitochondries correspondaient aux points de contact entre l'organelle et le réticulum endoplasmique (Friedman et al., 2011).



La caractérisation biochimique de Dnm1p indiquerait un mode d'action de cette protéine proche de celui des dynamines conventionnelles impliquées dans le processus d'endocytose. *In vitro*, Dnm1p oligomérisse sous forme de grandes spirales en présence de GTP ou d'un analogue non hydrolysable du GTP (Fukushima et al., 2001; Ingerman et al., 2005; Naylor et al., 2006). Une réduction du diamètre des spirales nouvellement formées permettrait la scission des membranes mitochondriales. La fixation du GTP à la dynamine serait suffisante pour l'auto-assemblage de la protéine et son adressage à la mitochondrie tandis que l'hydrolyse serait cruciale pour finaliser la division mitochondriale par fission des membranes. *In vitro*, DRP1 est oligomérisée sous forme d'anneaux présentant un diamètre semblable à celui des dynamines (Smirnova et al., 2001; Yoon et al., 2001). Cette différence entre DRP1 et Dnm1p pourrait indiquer que l'auto-assemblage de DRP1 *in vivo* nécessiterait des facteurs supplémentaires pour la formation de structures susceptibles de générer la constriction des membranes mitochondriales.

Chez les mammifères, alors que DRP1 est exprimée de manière ubiquitaire, des niveaux plus élevés sont toutefois détectés dans le cerveau, les muscles squelettiques et les cellules cardiaques (Smirnova et al., 1998). De plus, le cerveau possède une isoforme spécifique provenant d'un épissage alternatif comme nous le verrons ultérieurement.

L'activité de fission de DRP1 est modulée par différentes modifications post-traductionnelles. La translocation de DRP1 à la mitochondrie dépend de la déphosphorylation de la sérine 637 par la calcineurine (Cereghetti et al., 2008; Cribbs and Strack, 2007). Inversement, la phosphorylation par la PKA de cette sérine conduit à l'élongation mitochondriale par l'inhibition de la fission (Chang and Blackstone, 2007a). En effet, la phosphorylation de DRP1 par la PKA diminue les interactions intra-moléculaires de la dynamine et inhibe son activité GTPase. Au contraire, la phosphorylation de DRP1 sur la sérine 600 par la protéine kinase 1 $\alpha$  dépendante de la calmoduline (CaMKI $\alpha$ ) conduit à une activation de la fission en augmentant l'affinité de DRP1 pour FIS1 (Han et al., 2008).

DRP1 peut être mono-sumoylée par l'enzyme de conjugaison E2 Ubc9 (Ubiquitin-conjugating enzyme 9) et par la SUMO E3 ligase MAPL (Mitochondrial-Anchored Protein Ligase). Cette sumoylation stabilise DRP1 et permet ainsi l'activité de fission mitochondriale, observée entre autres lors de l'apoptose (Braschi et al., 2009; Harder et al., 2004; Wasiak et al., 2007). Inversement, la désomoylation de DRP1 par SENP5 restaure une morphologie mitochondriale normale (Zunino et al., 2007).

L'E3 ubiquitine ligase mitochondriale MARCH V interagit avec DRP1 et régule son recrutement au niveau des sites de fission sans moduler la stabilité de la protéine (Karbowski et al., 2007).



La nitrosylation de DRP1 par l'oxyde nitrique (NO) au niveau de la cystéine 644 localisée dans le domaine GED mène à une augmentation de l'activité GTPase de la protéine (Cho et al., 2009).

## **FIS1**

Fis1p chez *S.cerevisiae*, ou FIS1 chez l'homme, est ancrée à la membrane externe mitochondriale par son domaine C-terminal et est répartie de manière homogène sur l'ensemble de la membrane externe (James et al., 2003) (Mozdy et al., 2000; Stojanovski et al., 2004; Yoon et al., 2003). FIS1 est exprimée de manière ubiquitaire et ne présente pas de grandes variations d'expression dans tous les tissus analysés (Jofuku et al., 2005; Stojanovski et al., 2004). L'extinction de FIS1 par interférence à l'ARN induit l'élongation des mitochondries (Mozdy et al., 2000; Yoon et al., 2003). À l'inverse, sa surexpression dans des cellules HeLa et Cos-7 conduit à la fragmentation des mitochondries (James et al., 2003; Yoon et al., 2003).

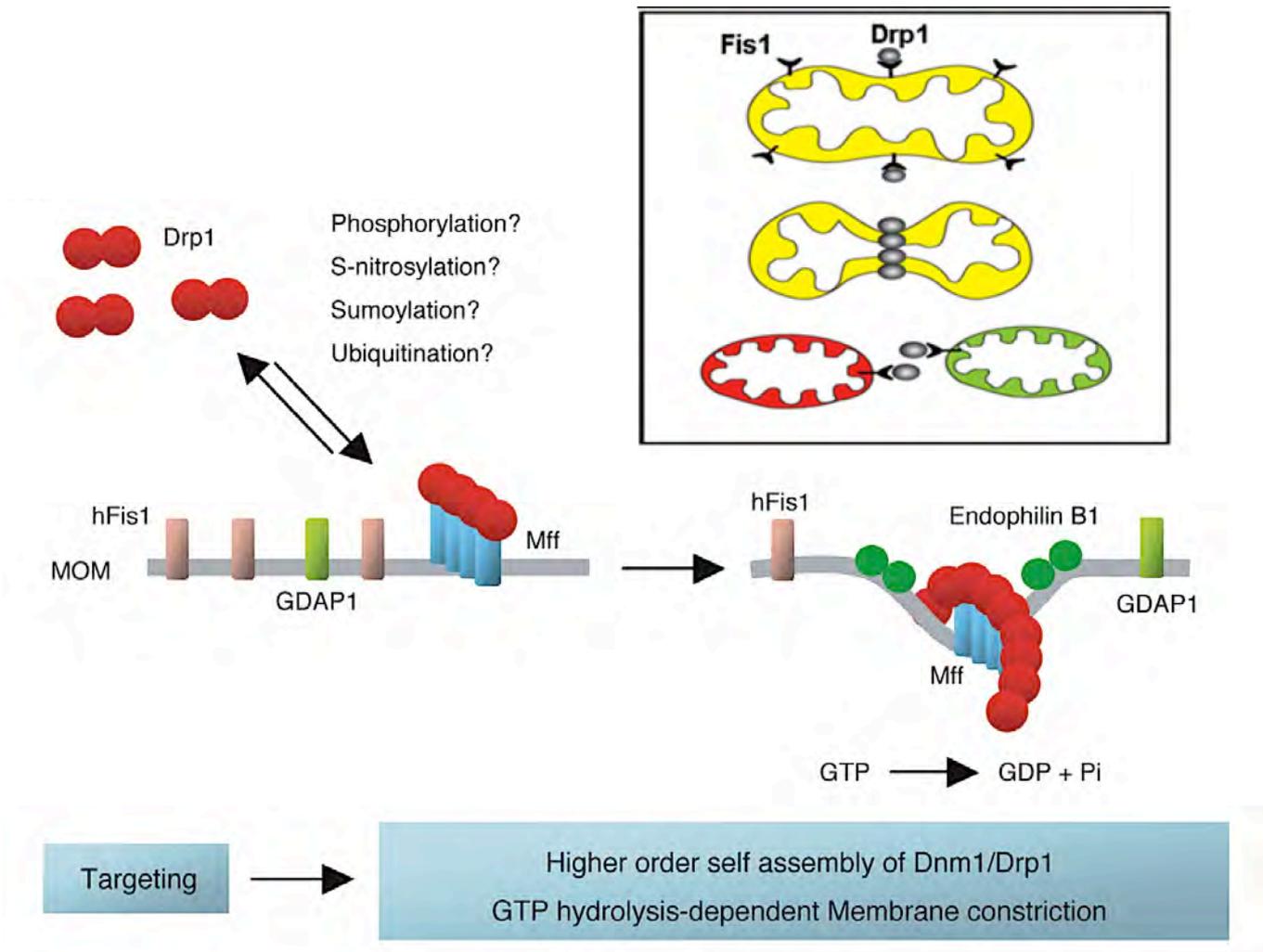
Outre leur rôle dans la fission des mitochondries, DRP1 et FIS1 sont également impliquées dans la fission des peroxysomes (Koch et al., 2003; Koch et al., 2005).

### I-2-2-2- Autres acteurs ou régulateurs de la fission

L'endophiline B1 est une fatty acyl transférase requise pour le maintien de la morphologie mitochondriale plus particulièrement au niveau de la dynamique de la membrane externe. Comme DRP1, l'endophiline B1 est transloquée à la membrane externe lors d'un processus apoptotique (Karbowski et al., 2004b).

GDAP1 (Ganglioside-induced Differentiation Associated Protein 1) ancrée à la membrane externe entraîne une augmentation de la fragmentation du réseau mitochondrial lorsqu'elle est surexprimée ou une filamentation des mitochondries lors de son extinction (Niemann et al., 2005; Wagner et al., 2009).

Mff (Mitochondrial fission factor) est une protéine ancrée à la membrane externe par une queue C-terminale et dont la partie N-terminale contenant un domaine coiled-coil, est exposée côté cytosol. La diminution de la protéine par interférence à l'ARN, provoque l'élongation des mitochondries et la disparition de DRP1 à la surface de la mitochondrie. À l'inverse, sa surexpression conduit à la fragmentation mitochondriale et l'augmentation de DRP1 à la mitochondrie. D'autre part, Mff interagirait directement avec DRP1 par sa région N-terminale et augmenterait l'activité GTPase de la dynamine, *in vitro* et *in vivo*



**Illustration 11: Modèles des mécanismes de fission impliquant DRP1 (tirés de Otera et al., 2011, Mattson et al., 2008)**

DRP1, protéine cytosolique se relocalise à la membrane externe mitochondriale. Dans ce modèle, DRP1 est recruté à la membrane par la protéine réceptrice Mff. Cette protéine permet également l'oligomérisation de DRP1 et d'optimiser l'activité GTPase de DRP1. La fission se réalise par constriction de l'anneau oligomérisé de DRP1. L'encart en haut à droite schématise le recrutement de DRP1 par FIS1, premier modèle proposé de recrutement de DRP1 à la membrane mitochondriale externe (Mattson 2008).

(Otera and Mihara, 2010). Alors que FIS1 est répartie de manière homogène sur la surface de la membrane externe mitochondriale, Mff est organisée de manière ponctuée, « puncta » qui colocalisent avec les foci de DRP1. Finalement, Mff semblerait le meilleur candidat pour le recrutement de DRP1 à la mitochondrie, comme présenté sur le modèle ci-dessous.

Très récemment deux nouveaux régulateurs de la fission, Mid49/51, ont été identifiés (Palmer et al., 2011). Il s'agit de protéines ancrées à la membrane interne qui forment des foci et des anneaux autour des mitochondries comme DRP1. Mid49/51 recrute directement DRP1 à la surface des mitochondries. La diminution de leur expression réduit l'association de DRP1 aux mitochondries et provoque un excès de fusion.

#### I-2-2-3- Existe-t-il une machinerie de fission de la membrane interne ?

Etant donné que les protéines qui jouent un rôle dans la fission mitochondriale sont toutes associées à la membrane externe, il semblerait que la fission de la membrane externe entraîne celle de la membrane interne, notamment par constriction des oligomères de DRP1. Cependant, la perte de l'activité GTPase de DRP1 chez *C.elegans* entraîne une impossibilité de fission de la membrane externe sans perturber celle de la membrane interne (Labrousse et al., 1999). En outre, la fission des membranes externe et interne est désynchronisée dans des cellules HeLa déficientes en Endophiline B1 (Karbowski et al., 2004b), ce qui suggère l'existence d'une machinerie de fission de la membrane interne. Certains travaux ont identifié la protéine MTP18, localisée au niveau de la membrane interne, comme un facteur influençant la fission mitochondriale (Tondera et al., 2005). D'autre part, MDM33 (Mitochondrial Distribution and Morphology) chez la levure et MTGM (Mitochondrial Targeting GxxxG Motif) identifié dans différents types de tumeurs de cerveaux de patients, sont situés au niveau de la membrane interne et joueraient un rôle dans la morphologie mitochondriale et la fission de la membrane interne (Messerschmitt et al., 2003; Zhao et al., 2009b). En dépit de ces premières observations, nous ne pouvons pas encore définitivement conclure quant à l'existence d'une machinerie de fission de la membrane interne.

#### I-2-2-4- Modèle de fission

Un modèle récent de fission mitochondriale proposé par Mihara fait intervenir la protéine Mff (Otera and Mihara, 2011). En premier lieu, DRP1 serait recrutée à la membrane externe mitochondriale par une interaction directe avec Mff qui permettrait l'oligomérisation de la dynamine, faciliterait son activité GTPase et conduirait ainsi à la formation d'un anneau de constriction ce qui, par voie de conséquence, entraîne la fission des membranes



mitochondriales (Illustration 11). Il reste à intégrer à ce modèle les nouveaux venus MiD49 et 51.

### I-2-3- Acteurs et mécanistique de la fusion mitochondriale

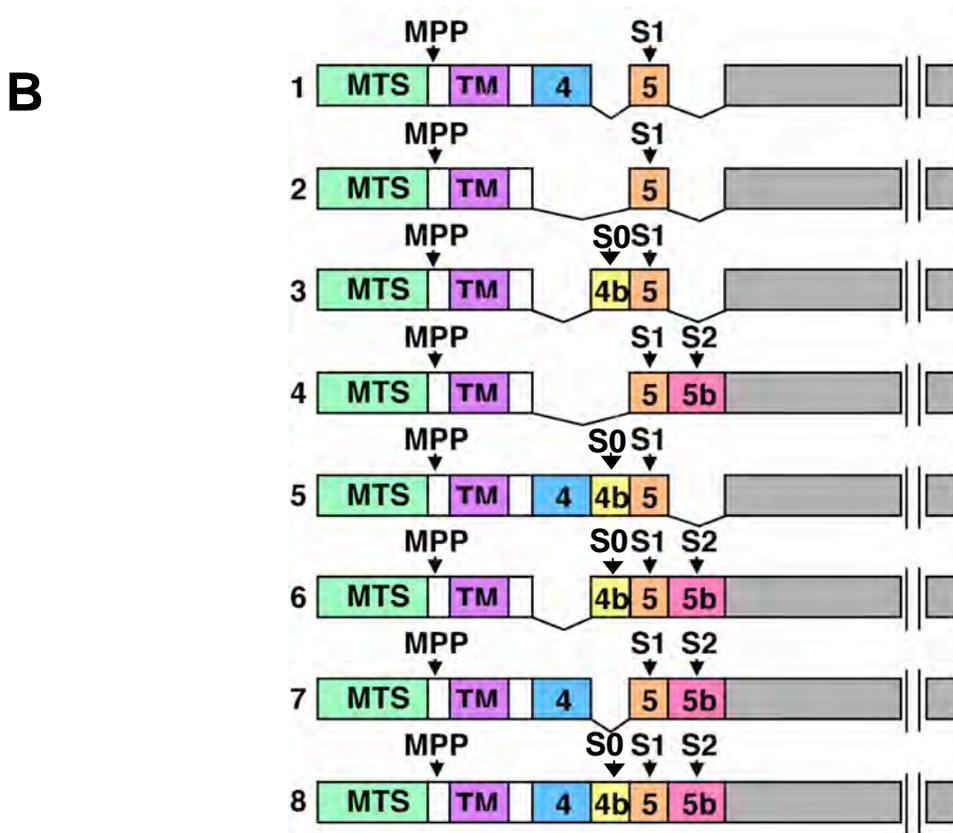
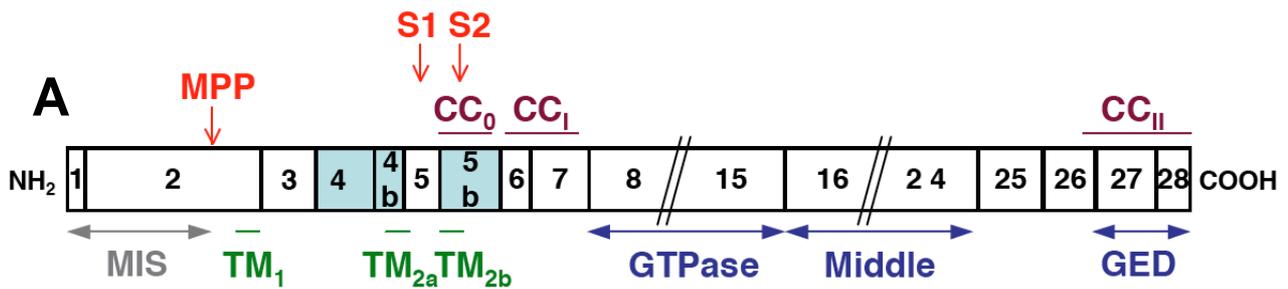
Contrairement à la fission mitochondriale, les machineries de fusion des membranes externes et internes ont elles été identifiées et caractérisées.

#### I-2-3-1- Les acteurs essentiels de la membrane externe : MFN1-2

Les Mitofusines 1 et 2 (MFN) sont des dynamines apparentées mammifères responsables de la fusion de la membrane externe (Chen et al., 2003; Eura et al., 2003; Santel and Fuller, 2001). Elles possèdent un homologue FZO1 chez la levure *S.cerevisiae* (Fritz et al., 2001; Rojo et al., 2002).

Les Mitofusines sont constituées d'un domaine GTPase N-terminal, d'une région coiled-coil HR1 (Heptad Repeat 1), de deux domaines transmembranaires permettant l'ancrage à la membrane externe et d'une dernière région coiled-coil HR2 C-terminale (Rojo et al., 2002; Santel and Fuller, 2001). Les Mitofusines traversent la membrane externe deux fois et leurs extrémités C et N-terminales font face au cytosol (Hermann et al., 1998; Rojo et al., 2002). Au cours de la fusion, les mitofusines sont capables d'interagir « en trans » de manière homotypique ou hétérotypique grâce à leurs domaines HR2, permettant ainsi le rapprochement des mitochondries, étape indispensable à la fusion (Chen et al., 2005; Detmer and Chan, 2007; Koshiba et al., 2004). L'hydrolyse du GTP fournirait alors l'énergie nécessaire à la fusion des deux membranes externes (Chen et al., 2003; Ishihara et al., 2004; Meeusen et al., 2004).

La perte de fonction de l'une ou des deux isoformes des mitofusines mène à la fragmentation des mitochondries (Chen et al., 2003). Cependant, malgré une certaine forme de redondance, il existe des différences notables entre MFN1 et MFN2. Tout d'abord, au niveau de leur expression : MFN2 est essentiellement exprimée dans le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau, alors que MFN1 est exprimée de façon équivalente dans tous les tissus (Santel et al., 2003). La perte de MFN1 conduit à des mitochondries sphériques de taille homogène, qui sont libres dans le cytosol. À l'inverse, les mitochondries dépourvues en MFN2 sont sphériques et de taille hétérogène, et faiblement associées (Chen et al., 2003). D'autre part, la forme recombinante de MFN1 possède une activité GTPase plus importante et une affinité pour le GTP plus faible par rapport à MFN2 (Ishihara et al., 2004). Contrairement à MFN1, une petite fraction de MFN2 est présente aux points de contacts entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique (de Brito and Scorrano, 2008). Enfin,



**Illustration 12: Représentation schématique de la protéine OPA1 et ses 8 variants d'épissage humains** (tiré de Song et al., 2007)

**A:** Trois domaines, GTPase, Middle et GED (coiled-coil II, CCII) sont communs aux différents membres de la famille dynamine. Une séquence d'adressage à la mitochondrie (MIS) suivie par un domaine transmembranaire (TM1) situés en partie N-terminale sont spécifiques d'OPA1. Deux domaines coiled-coil supplémentaires, CC0 et CC1, sont respectivement localisés dans les exons 5b et les exons 6 et 7.

**B:** Les 8 variants d'épissage diffèrent par la présence ou non des exons 4, 4b et 5b. Le clivage du signal d'import (MTS) à la mitochondrie localisé en amont du domaine trans-membranaire (TM) par la peptidase matricielle (MPP) génère les isoformes longues d'OPA1. Les clivages au niveau des sites S0, S1 et S2 mènent aux isoformes courtes.

contrairement à MFN1, MFN2 intervient dans le métabolisme oxydatif et l'apoptose (Bach et al., 2003; Pich et al., 2005; Sugioka et al., 2004).

### I-2-3-2- L'acteur essentiel de la membrane interne : OPA1

La fusion de la membrane interne fait appel à OPA1, une protéine codée par le génome nucléaire identifiée au laboratoire comme l'homologue humain de Mgm1p chez *S.cerevisiae* et Msp1p chez *S.pombe* (Berger and Yaffe, 1996; Delettre et al., 2000; Jones and Fangman, 1992; Pelloquin et al., 1998). OPA1 est une dynamine, avec un domaine GTPase central, un domaine middle et un domaine coiled-coil carboxy-terminal (CC-II) considéré comme le domaine effecteur des GTPases (GED). En partie N-terminale, un signal d'import mitochondrial (MIS) est suivi par un domaine hydrophobe potentiellement transmembranaire (TM1) et par un domaine coiled-coil (CC-I) (Gripalic et al., 2004; Misaka et al., 2002; Olichon et al., 2002). Les deux domaines CC-I et CC-II pourraient être responsables de la formation de complexes homotypiques d'OPA1 (Akepati et al., 2008).

OPA1 est ancrée au niveau de la membrane interne mitochondriale et fait face à l'espace intermembranaire (Gripalic et al., 2004; Ishihara et al., 2006; Misaka et al., 2002; Olichon et al., 2002; Satoh et al., 2003). Des études par microscopie électronique montrent un enrichissement de la protéine OPA1 au niveau des crêtes mitochondriales (Gripalic et al., 2004; Olichon et al., 2002). Cette dynamine a également été retrouvée associée à la membrane externe mitochondriale (Satoh et al., 2003).

Chez l'homme, le cadre de lecture d'OPA1 possède 31 exons dont 3 alternativement épissés (4, 4b et 5b) ce qui donne 8 ARNm alternatifs (Illustration 12A et B). Bien qu'OPA1 soit d'expression ubiquitaire, celle-ci varie de façon différentielle suivant les tissus. De forts niveaux d'expressions des ARNm OPA1 sont visibles dans la rétine, le cerveau, le foie, le cœur et le pancréas (Akepati et al., 2008; Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2001; Delettre et al., 2000). Chacun des huit variants d'épissage donnent de 1 à 3 isoformes protéiques issues de clivages protéolytiques intra-mitochondrial (Song et al., 2007). Les cellules HeLa expriment principalement les variants ARNm 1 et 7, et l'on détecte cinq isoformes protéiques d'OPA1 en conditions physiologiques : 2 longues (isoformes a et b) et trois courtes (isoformes c, d et e) (voir résultats). L'analyse par spectrométrie de masse des 5 bandes d'OPA1 révèle que les isoformes a et b correspondent respectivement aux formes longues des variants 1 et 7 clivées en position N87/F88, tandis que les isoformes c, d et e résultent d'un clivage protéolytique additionnel (Akepati et al., 2008; Ishihara et al., 2006). Il



existe 3 sites de clivage : S1, S2 et S3 respectivement localisés dans l'exon 5, l'exon 5b et l'exon 4b (Griparic et al., 2007; Ishihara et al., 2006; Song et al., 2007) (Illustration 12B).

Alors que la peptidase mitochondriale matricielle (MPP) est impliquée dans la génération des formes longues d'OPA1, différentes protéases ont été impliquées dans la formation des formes courtes d'OPA1 : les m-AAA et i-AAA protéases et les protéases PARL (Presenilin Associated Rhomboïd Like protease) et OMA1. Les m-AAA protéases sont des métalloprotéases ATP-dépendantes ancrées à la membrane interne de la mitochondrie, leur site actif faisant face à la matrice (Langer et al., 2001). Il existe 3 types de m-AAA protéases chez les mammifères : la paraplégine, AFG3L1 et AFG3L2. La surexpression de la paraplégine augmente le clivage d'OPA1 au niveau de S1. En revanche, la délétion du gène de cette protéase dans des fibroblastes de souris, ne perturbe pas le patron de la dynamine (Duvezin-Caubet et al., 2007; Guillery et al., 2008; Ishihara et al., 2006). Les prohibitines, qui régulent l'activité des m-AAA protéases, affectent également le clivage d'OPA1, menant à l'accumulation des isoformes courtes au détriment des isoformes longues dans des fibroblastes de souris invalidées pour PHB2 (Merkwirth and Langer, 2009).

La protéase Yme1L, une i-AAA protéase située dans la membrane interne mitochondriale dont le domaine catalytique est exposé vers l'espace intermembranaire, est responsable du clivage de la protéine OPA1 au niveau des sites S0 et S2 (Langer et al., 2001; Shah et al., 2000) (Griparic et al., 2007; Song et al., 2007). Néanmoins, la réduction de la quantité de la protéine PARL par interférence à l'ARN, ou son invalidation chez la souris, n'a pas vraiment d'impact sur le clivage d'OPA1 (Duvezin-Caubet et al., 2007).

L'ensemble de ces protéases est impliqué dans le clivage d'OPA1 à l'état basal. Or, ce clivage est aussi possible en situation d'apoptose ou lors d'une diminution du potentiel de membrane mitochondrial induite, par exemple, par le CCCP. Récemment, la métalloprotéase indépendante de l'ATP OMA1 a été impliquée dans la production d'isoformes courtes lors de dysfonctions mitochondriales menant à la chute du potentiel de membrane mitochondrial (Ehses et al., 2009).

La protéine OPA1 intervient dans la fusion mitochondriale. Son extinction par interférence ARN, dans les cellules HeLa et Cos-7, et l'invalidation du gène Opa1 dans des fibroblastes embryonnaires murins, induisent la fragmentation du réseau mitochondrial (Griparic et al., 2007; Griparic et al., 2004; Olichon et al., 2003; Song et al., 2007). À l'inverse, la surexpression d'OPA1 dans des MEF et des NIH3T3, qui possèdent un réseau mitochondrial initialement fragmenté, provoque l'élongation de mitochondries (Cipolat et al., 2004; Olichon et al., 2002). Ces données mettent en évidence le rôle fusogène d'OPA1, rôle confirmé par des études montrant l'incapacité des mitochondries dépourvues d'OPA1 à



fusionner (Arnoult et al., 2005a; Chen et al., 2005; Griparic et al., 2007). De manière surprenante, la surexpression de cette dynamine dans des cellules possédant un réseau mitochondrial originellement filamenteux, provoque la fragmentation des mitochondries sans inhibition de fusion (Chen et al., 2005; Cipolat et al., 2004; Griparic et al., 2004; Misaka et al., 2002). La fragmentation pourrait être causée par une activation de la fission due à un excès de fusion ou d'une grande quantité d'OPA1 favorisant le processus de fusion transitoire. La fusion dite transitoire (kiss and run) est due à des interactions latérales entre des mitochondries associées à des microtubules distincts qui vont échanger rapidement et partiellement des éléments solubles sans affecter la morphologie mitochondriale (Liu et al., 2009b). À l'inverse, la fusion dite complète de mitochondries se déplaçant l'une vers l'autre le long d'un microtubule autorise le mélange de tous les composants mitochondriaux et affecte la morphologie mitochondriale. L'extinction ou la surexpression de la protéine OPA1 favorise la fusion transitoire.

La maturation protéolytique d'OPA1 est cruciale dans la régulation de l'activité fusogène de la protéine. En effet, la disparition des formes longues de la dynamine, après un traitement par un agent découplant, semble indiquer que les formes longues sont nécessaires au processus de fusion mitochondriale (Guillery et al., 2008). Néanmoins, les études sur des mutants des sites de clivage S1 et S2 soulignent également l'importance des formes courtes dans le contrôle de la morphologie mitochondriale (Duvezin-Caubet et al., 2006; Griparic et al., 2007; Song et al., 2007). Finalement, des travaux de réintroduction de différents variants d'OPA1 dans les MEF indiquent la nécessité de la présence d'au moins une forme longue et une forme courte d'OPA1 pour fusionner les mitochondries dans des conditions basales (Song et al., 2007). Ce n'est pas le cas en conditions d'hyperfusion liée à un stress où seule la forme longue d'OPA1 est indispensable (Tondera et al., 2009).

#### I-2-3-3- D'autres acteurs de la fusion

La mitoPLD est une phospholipase D mitochondriale qui permet la modification *in vitro* et *in vivo* du profil des lipides mitochondriaux avec une diminution de la quantité du cardiolipide au profit de l'acide phosphatidique (Choi et al., 2006). La diminution de la mitoPLD par interférence à l'ARN dans des cellules HeLa, provoque la fragmentation des mitochondries et affecte la fusion mitochondriale. Du fait de son rôle sur les lipides, la mitoPLD modifierait la composition et la courbure des bicouches lipidiques les rendant plus aptes à la fusion des membranes mitochondriales.



MIB, une protéine de la superfamille des déshydrogénases réductases est un partenaire des Mitofusines qui est exprimée dans tous les tissus (Eura et al., 2006). La réduction de la quantité de cette protéine par interférence à l'ARN mène à l'élongation des mitochondries alors que sa surexpression fragmente le réseau mitochondrial. MIB contrôlerait la fusion des mitochondries en interagissant et en régulant la MFN1 (Eura et al., 2006).

La protéine SLP-2 (Stomatin-Like Protein2), une protéine localisée dans l'espace intermembranaire, est un membre de la famille SPFH (Stomatin/Prohibitin/Flotillin/Hflk). Cette protéine a d'abord été identifiée comme un partenaire de MFN2 (Hajek et al., 2007). Récemment, sa participation au processus d'hyperfusion a été démontrée en réponse à plusieurs stress cellulaires (UV, traitement à la cycloheximide) (Tondera et al., 2009). Cette hyperfusion induite par le stress (SIMH) permet à la cellule de contrer ce phénomène via une élévation de la production d'ATP. Au cours de ce processus, SLP-2 empêche le clivage des formes longues d'OPA1 de manière indépendante des Prohibitines 1 et 2 avec lesquelles elle peut interagir (Da Cruz et al., 2008).

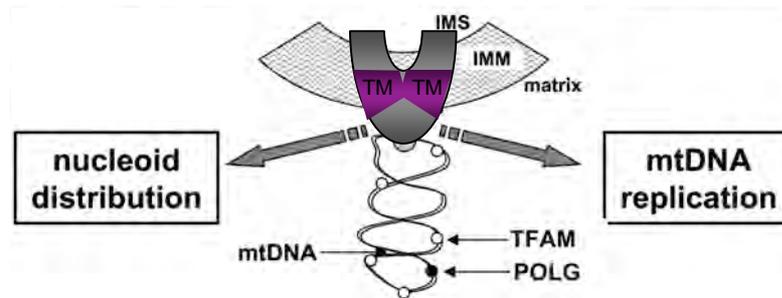
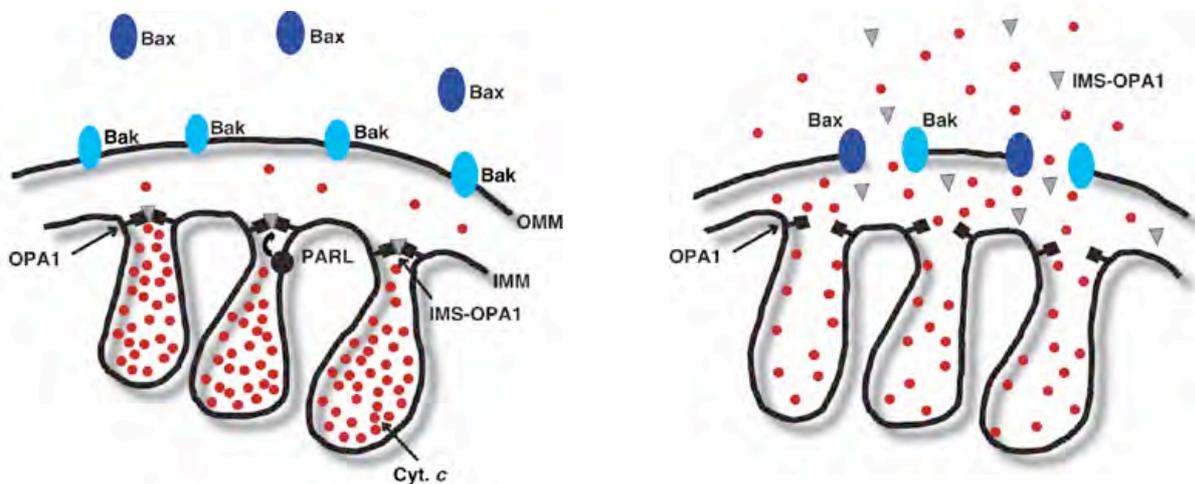
#### I-2-3-4- Couplage de la fusion des deux membranes

La fusion des membranes externe et interne se réalise de manière indépendante (Malka et al., 2005; Meeusen et al., 2004). Par contre, ces fusions ont lieu de manière synchronisée (Meeusen et al., 2006; Song et al., 2009).

Ugo1, une protéine essentielle à la fusion mitochondriale chez *S.cerevisiae* et *S.pombe*, coordonne la fusion des deux membranes en jouant le rôle d'adaptateur (Sesaki and Jensen, 2001). En effet, *in vitro*, des protéines mutantes d'Ugo1 présentent un défaut de fusion des membranes mitochondriales internes et externes (Hoppins and Nunnari, 2009). En dépit du fait qu'aucun homologue de cette protéine n'a été mis en évidence chez les mammifères, la synchronisation des 'deux fusions' semble être conservée chez les eucaryotes supérieurs. En effet, le rôle fusogène d'OPA1 n'est possible qu'en présence de MFN1 (Cipolat et al., 2004), hypothèse renforcée par les travaux de notre équipe démontrant que les protéines OPA1 et les Mitofusines font partie d'un même complexe protéique dans des cellules HeLa (Guillery 2008).

#### I-2-4- Dynamique mitochondriale et fonctions des mitochondries

Outre son rôle dans le contrôle de la morphologie des mitochondries, la dynamique mitochondriale influence différentes fonctions de l'organelle. En effet, la modulation de

**A****B**

**Illustration 13: OPA1, maintien du génome et structuration des crêtes mitochondriales** (tiré de Elachouri et al., 2010 et Delivani & Martins, 2006)

**A:** Représentation du modèle proposé par l'équipe de G. Leeners montrant l'interaction d'OPA1 avec un nucléoïde par la région 4b.

**B:** Représentation schématique du modèle proposé par Yamaguchi montrant le remodelage de la membrane mitochondriale interne lors de l'apoptose. Dans les cellules saines (à gauche), les oligomères d'OPA1 régulent l'ouverture des jonctions des crêtes et restreignent le passage du Cytochrome c, ainsi que d'autres protéines séquestrées dans l'espace intermembranaire mitochondrial (IMS). La protéase PARL, est nécessaire à l'assemblage des oligomères d'OPA1. Des stimuli pro-apoptotiques activent les protéines BH3-only et provoquent l'ouverture du canal de Bax / Bak (à droite), Les oligomères d'OPA1 sont déstabilisés. Ceci provoque le remodelage de la membrane interne mitochondriale et la libération du cytochrome c contenu dans les crêtes. Une petite fraction d'OPA1 peut aussi être libéré dans le cytosol.

OMM : membrane externe mitochondriale; IMM, membrane interne mitochondriale.

l'expression des principaux acteurs de ce processus affecte la respiration, l'apoptose, l'homéostasie calcique et le 'contrôle qualité' de l'organelle.

#### I-2-4-1- Le maintien du génome mitochondrial

Dans les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, il est clairement établi que la fragmentation du réseau mitochondrial induite par l'inactivation de l'un des acteurs de la fusion (Fzo1p, Ugo1p ou Mgm1p/Msp1p) s'accompagne de la perte du génome mitochondrial (Diot et al., 2009; Guan et al., 1993; Guillou et al., 2005; Hermann and Shaw, 1998; Jones and Fangman, 1992; Meeusen et al., 2006; Pelloquin et al., 1999; Rapaport et al., 1998; Sesaki and Jensen, 2001; Wong et al., 2003; Zick et al., 2009). De plus, la délétion du gène de fission *DNM1<sup>+</sup>* supprime à la fois la fragmentation induite par l'inactivation des acteurs de fusion et la perte du génome mitochondrial. Ces observations laissent supposer l'existence de liens très étroits entre le processus de fusion et le maintien du génome mitochondrial.

Ces liens existent également chez les mammifères, mais ne semblent pas restreints à la fusion. Dans des fibroblastes et des muscles de souris doublement délétées pour les mitofusines, les mitochondries, qui sont totalement incapables de fusionner, présentent, pour certaines, une diminution du nombre de leurs nucléoïdes et, pour les autres, une augmentation du nombre de mutations de l'ADNmt (Chen et al., 2007; Chen et al., 2010). De plus, la perte de DRP1 dans des cellules HeLa mène à une réduction de l'ADNmt (Parone et al., 2008). De même, des MEF invalidées pour la protéine OPA1 voient leur contenu en ADNmt diminuer (Chen et al., 2007; Chen et al., 2010). Le rôle d'OPA1 au niveau du maintien de l'ADNmt pourrait s'exercer de façon indirecte par le biais de son effet sur la structure de la membrane interne mitochondriale. La perte d'OPA1, qui provoque comme son homologue de levure une destructuration des crêtes (Griparic et al., 2004; Olichon et al., 2003; Sesaki et al., 2003), pourrait perturber la réplication de l'ADNmt en perturbant l'ancrage du génome à la membrane interne. D'autre part, l'effet d'OPA1 sur le maintien du génome mitochondrial pourrait être plus direct. L'équipe de Guy Lenaers a en effet proposé qu'OPA1 lierait de manière directe les nucléoïdes à la membrane interne mitochondriale par l'intermédiaire de la séquence peptidique codée par son exon 4b (Elachouri et al., 2010). Grâce à cette interaction, OPA1 contrôlerait la réplication de l'ADNmt et la distribution des nucléoïdes (Illustration 13A).



#### I-2-4-2- L'apoptose

Les premiers travaux concernant l'impact de la dynamique mitochondriale sur le processus d'apoptose ont conduit à un modèle dans lequel un déplacement de l'équilibre de la dynamique mitochondriale vers la fission rend les cellules plus sensibles à l'apoptose alors qu'à l'inverse, un déplacement de l'équilibre vers la fusion rend les cellules plus résistantes (Wang and Youle, 2009).

Au cours de l'apoptose, dans plusieurs types cellulaires, le réseau mitochondrial se fragmente de manière DRP1 dépendante (Arnoult et al., 2005b; Breckenridge et al., 2003; Frank et al., 2001; Lee et al., 2004; Sugioka et al., 2004). Cette fragmentation s'accompagne d'une inhibition partielle de la libération du cytochrome c et retarde l'entrée des cellules en apoptose (Arnoult et al., 2005b; Barsoum et al., 2006; Estaquier and Arnoult, 2007; Frank et al., 2001; Parone et al., 2008). Récemment, la découverte d'un inhibiteur de DRP1, le Mdivi-1, a permis de proposer que DRP1 aurait un rôle propre dans la perméabilisation de la membrane externe. En effet, cette molécule, qui en se fixant sur DRP1 bloque son oligomérisation et diminue son activité GTPase, empêche la libération du cytochrome c in vitro sur mitochondrie isolées (Cassidy-Stone et al., 2008; Lackner and Nunnari, 2010).

La réduction de l'expression de FIS1 par interférence ARN provoque l'élongation des mitochondries et une résistance à l'apoptose, alors que sa surexpression conduit à la fragmentation du réseau mitochondrial et mène à la libération du cytochrome c (James et al., 2003; Lee et al., 2004; Yoon et al., 2003). FIS1 intervient donc dans la mort cellulaire. Néanmoins, la fission peut être découplée du processus apoptotique. En effet, un mutant de la région trans-membranaire de FIS1 conduit à la fission des mitochondries mais pas à la mort des cellules (James et al., 2003; Lee et al., 2004). De plus, la surexpression de FIS1 dans des cellules invalidées pour les protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, BAX et BAK, induit la fragmentation des mitochondries mais pas l'apoptose (Alirol et al., 2006).

La perte de la protéine OPA1 provoque une apoptose spontanée ou une augmentation de la sensibilité à l'apoptose (Lee et al., 2004; Olichon et al., 2003). Inversement la surexpression d'OPA1 protège de la mort induite par divers agents pro-apoptotiques (Frezza et al., 2006). Il a été montré que le rôle anti-apoptotique d'OPA1 est indépendant de son action fusogène et qu'il s'exerce grâce à son rôle dans le remodelage des crêtes mitochondriales (Illustration 13B). En effet, la sur-expression d'OPA1 dans des cellules dont l'expression d'OPA1 est MFN1 est diminuée, les mitochondries sont incapables de fusionner mais restent résistantes à l'apoptose (Cipolat et al., 2004; Cipolat et al., 2006).



Les formes courtes solubles de la dynamine participeraient à l'élaboration de complexes avec les formes longues intégrales au niveau de la jonction des crêtes mitochondriales, ce qui permettrait leur maintien dans une forme dite « fermée » en conditions physiologiques (Cipolat et al., 2006; Darshi et al., 2010; Frezza et al., 2006). Cette conformation dite « fermée » permettrait la séquestration du cytochrome c dans l'IMS intra-crêtes où il joue son rôle de transporteur d'électrons. L'induction de l'apoptose mènerait à la dissociation des complexes d'OPA1, à « l'ouverture » des jonctions des crêtes et par voie de conséquence à la mobilisation du cytochrome c de l'espace intra-crêtes vers l'espace intermembranaire (Cipolat et al., 2006; Frezza et al., 2006; Landes et al., 2010a; Scorrano et al., 2002; Sun et al., 2007). Dans les études de L. Scorrano, l'ouverture des jonctions des crêtes correspond à l'élargissement de leur diamètre, alors qu'au contraire, les travaux de Yamaguchi montrent que l'état ouvert des jonctions des crêtes s'accompagne du rétrécissement de leur diamètre (Yamaguchi et al., 2008). Il est à noter que, quel que soit le diamètre des jonctions des crêtes mesuré (ouvert, fermé, élargi), il est de toute façon assez large pour laisser passer le cytochrome c. OPA1 pourrait donc agir, au niveau des jonctions des crêtes, comme une barrière de diffusion membranaire (Perkins et al., 2009).

#### I-2-4-3- La phosphorylation oxydative

Plusieurs études ont révélé l'importance des acteurs de la dynamique mitochondriale sur la phosphorylation oxydative. Ainsi, la perte de MFN2 entraîne une diminution de la respiration, la perte du potentiel de membrane mitochondrial, la baisse de la capacité respiratoire des complexes I, III et IV et une réduction de la quantité protéique des complexes I, II, III et V (Chen et al., 2005; Pich et al., 2005). À l'inverse, la surexpression de MFN2 conduit à une élévation du potentiel de membrane mitochondrial et à une augmentation de l'expression de certaines sous-unités des complexes I, IV et V de la chaîne respiratoire (Pich et al., 2005).

De plus, une diminution de la protéine OPA1 dans des MEF entraîne une chute du potentiel de membrane mitochondrial, lié à une réduction sévère de la respiration avec une diminution de la consommation en oxygène conduite par les CI, III et IV (Chen et al., 2005). Récemment, des expériences menant à la perte de la protéine OPA1 dans les cellules Bêta du pancréas ont montré qu'elle provoquait une diminution de l'activité du complexe IV menant à un défaut de la production d'ATP (Zhang et al., 2011).

Perturber la fusion mitochondriale altérerait donc le métabolisme énergétique. Réciproquement, il a été proposé que les mitochondries filamenteuses seraient plus énergétiques (Skulachev, 2001). En accord avec cette hypothèse, une élongation



mitochondriale est observée dans les levures cultivées en milieu respiratoire c'est-à-dire qui favorise l'activité de la chaîne respiratoire (Jakobs et al., 2003). Lorsque l'on force la phosphorylation oxydative dans des cellules HeLa en les cultivant en présence de galactose, on augmente à la fois l'expression des complexes de la chaîne respiratoire et l'élongation des mitochondries (Rossignol et al., 2004). Récemment, l'existence d'un processus d'hyperfilamentation mitochondriale en réponse à différents stress (SIMH) a été mis en évidence par l'équipe de JC Martinou (Tondera et al., 2009). La SIMH, qui dépend d'OPA1 et de MFN1, conférerait une résistance accrue aux cellules face à un stress grâce à une élévation de la production en ATP. Cette élongation permettrait dans le cas d'un stress nutritionnel, d'augmenter la production d'ATP mitochondrial et ainsi de sauver des mitochondries de la mitophagie (Gomes et al., 2011). L'hyperfilamentation mitochondriale stimulerait la synthèse en ATP en augmentant la surface des crêtes et l'oligomérisation de l'ATPase. Là encore, cette élongation mitochondriale requiert la machinerie de fusion et nécessite de plus l'inactivation de DRP1.

#### I-2-4-4- Contrôle qualité

L'autophagie joue un rôle d'entretien de la cellule en maintenant un « contrôle qualité » par le renouvellement des organelles et en dégradant les agrégats protéiques. Elle permet la survie et l'adaptation de la cellule face à un stress (Mizushima, 2007). Chez les mammifères, les mitochondries endommagées sont dégradées selon le processus d'autophagie spécifique, la mitophagie (Kim et al., 2007).

La fission des mitochondries est un élément clef du mécanisme d'autophagie. Elle permet d'isoler une partie endommagée du mitochondriome afin de la conduire à la dégradation. Lorsque la fission engendre une mitochondrie dépolarisée, celle-ci, qui est incapable de fusionner et qui présente une réduction de la quantité de la protéine OPA1, est alors engagée dans un processus de mitophagie (Twig et al., 2008). La surexpression d'OPA1 qui élève la capacité des mitochondries à fusionner, ainsi que l'inactivation de FIS1 et de DRP1 qui inhibe la fission, réduisent les niveaux de mitophagie. De plus, l'ubiquitinylation des mitofusines par la voie PINK1/Parkine mènerait à leur dégradation, rendant les mitochondries incompetentes pour fusionner, ce qui provoquerait la mitophagie (Tanaka et al., 2010).

La fusion jouerait également un rôle important dans le contrôle qualité des mitochondries, en permettant le mélange du contenu d'une mitochondrie intacte avec une mitochondrie faiblement endommagée. Ainsi, cette coopération entre les mitochondries permettrait de compléter les déficiences fonctionnelles de certaines d'entre elles en



restaurant des éléments manquants ou peu fonctionnels par échange de leur membrane et de leur contenu.

#### I-2-4-5- La gestion du calcium

Certains travaux ont montré que la dynamique mitochondriale influence l'homéostasie calcique.

Ainsi, la surexpression de la protéine de fission hFIS1 dans des cellules HeLa allonge le temps nécessaire pour atteindre une concentration calcique mitochondriale comparable à celle des contrôles par l'entrée du calcium *via* la membrane plasmique. Le retard occasionné n'est pas dû à une diminution du potentiel de membrane mitochondrial qui aurait entraîné une diminution de la captation de calcium, mais plutôt à un problème d'éloignement des sites d'entrée du calcium extracellulaire. En effet, la surexpression de hFIS1 provoque un regroupement des mitochondries au niveau périnucléaire qui deviennent trop éloignées de la membrane plasmique pour permettre une captation calcique rapide (Frieden et al., 2004).

De même, la surexpression de DRP1 dans des cellules HeLa ne perturbe pas le potentiel de membrane mitochondrial mais réduit la captation calcique mitochondriale à partir du réticulum endoplasmique (RE) et ce, en diminuant l'efficacité de diffusion du calcium intra-mitochondrial (Szabadkai et al., 2004). Cette diminution est liée à la fragmentation du réseau mitochondrial, au sein duquel la propagation calcique se fait de façon efficace (Szabadkai et al., 2004).

L'équipe de L. Scorrano a montré qu'un enrichissement en MFN2 aux sites de contact entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries permet la stabilité de microdomaines impliquant les deux organelles (de Brito and Scorrano, 2008). Leurs travaux montrent que dans des MEF invalidées pour MFN2, le réticulum endoplasmique est éloigné des mitochondries, réduisant ainsi leurs points de contact et d'échanges calciques. MFN2 serait également impliquée indirectement dans la formation de microdomaines entre le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique. En effet, MFN2 serait importante pour la formation des complexes de la protéine STIM1 localisée au réticulum endoplasmique et nécessaire à l'activation du canal CRAC à partir duquel le calcium extracellulaire rentre dans la cellule (Singaravelu et al., 2011). Ainsi, les mitochondries contrôleraient l'activité du canal CRAC grâce à MFN2 qui stabilise les microdomaines réticulum-membrane plasmique (Hoth et al., 2000; Hoth et al., 1997; Parekh, 2003, 2008).

Si la dynamique mitochondriale influence l'homéostasie calcique, l'inverse est également vrai. Ainsi l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique, *via* les stocks calciques du réticulum endoplasmique, provoque une fragmentation des



mitochondries (Hom et al., 2007). Cette fragmentation requiert la captation du calcium par la mitochondrie et les acteurs de fission DRP1 et FIS1. À des concentrations calciques cytosoliques physiologiques, la PKA inhibe l'activité de DRP1 par phosphorylation sur la sérine 637 (Chang and Blackstone, 2007a). À l'inverse, de fortes concentrations calciques sur de longues durées activent la calcineurine qui déphosphoryle DRP1 sur cette même sérine et mène à une fragmentation générale des mitochondries (Cereghetti et al., 2008). Ces effets opposés de la calcineurine et de la PKA permettent une adaptation de la morphologie des mitochondries en fonction de la durée et de la force de la vague calcique.

La morphologie mitochondriale est également sous le contrôle du calcium par le biais de son action sur la mobilité mitochondriale. Miro, une protéine de transport des mitochondries sur les microtubules, influence la morphologie mitochondriale de manière 'DRP1-dépendante' (Saotome et al., 2008). Lorsque cette protéine est surexprimée dans les cellules de la lignée H9c2, les mitochondries s'allongent par inhibition de la fission dépendante de DRP1. Cette protéine motrice est elle-même sous l'influence du calcium. En effet, à de faibles concentrations calciques, les protéines Miro facilitent le transport des mitochondries et inhibent la fission. Au contraire, à de fortes concentrations calciques, la liaison du calcium à Miro inhibe la mobilité des mitochondries et les fissionne *via* DRP1. Ce qui permettrait le positionnement des organelles à proximité des sources calciques et augmenterait ainsi le tampon calcique et la production d'ATP à des sites en forte activité (Brough et al., 2005; Hoth et al., 2000; Jouaville et al., 1995; Malli et al., 2003; Park et al., 2001; Quintana et al., 2006; Rintoul et al., 2003; Yi et al., 2004).

### I-2-5- Les maladies associées

L'importance fonctionnelle de la dynamique mitochondriale est mise en évidence par son implication dans des maladies neurodégénératives. De façon surprenante, alors que la dynamique mitochondriale est à l'œuvre dans tous les types cellulaires, à l'heure actuelle les seules pathologies liées à des mutations d'acteurs qui contrôlent ce processus provoquent des atteintes neuronales.

Ainsi, des mutations des deux protéines fusogènes MFN2 et OPA1 provoquent respectivement la maladie de Charcot Marie Tooth de type 2A (CMT2A) et l'Atrophie Optique Dominante de type 1 (ADOA-1). Une forme 4A de la maladie de Charcot Marie Tooth est, elle, due à une mutation d'un acteur de la fission : GDAP1 (Baxter et al., 2002; Cuesta et al., 2002; Pedrola et al., 2005). Signalons que des mutations de GDAP1 ont également été retrouvées chez des patients atteints de CMT2A (Cassereau et al., 2009).



Une mutation de la protéine DRP1 est responsable d'une neuropathie associée à de multiples autres syndromes (concentrations élevées en lactate dans le sang et dans le liquide céphalo-rachidien, problèmes de développement cérébral, atrophie du nerf optique) chez une petite fille décédée 37 jours après sa naissance (Waterham et al., 2007).

Les maladies de la CMT2-A et l'ADOA-1 étant à ce jour les mieux caractérisées, nous les présentons plus en détail.

La maladie de Charcot-Marie-Tooth de type de 2A (CMT2A) fait partie du groupe des neuropathies héréditaires motrices et sensitives les plus courantes (1 personne sur 2500). La CMT2A est une forme axonale à transmission autosomique dominante des CMT (Cartoni and Martinou, 2009; Zuchner et al., 2004) due majoritairement à une soixantaine de mutations du gène codant pour la MFN2. Une famille possédant une mutation de KIF1B, un moteur des microtubules, est également atteinte de CMT2A (Zhao et al., 2001) et ce, par une altération du transport des vésicules synaptiques et des mitochondries. Néanmoins, la majeure partie des cas est due à une mutation du gène MFN2. Cette maladie conduit à une atteinte progressive des nerfs périphériques et s'accompagne d'une amyotrophie distale généralement des membres inférieurs. La transmission autosomique dominante suggère que les mutations du gène MFN2 entraînent soit un effet d'haploinsuffisance, soit de dominance négativité. Le travail de Verhoeven sur plus de 300 malades atteints de la CMT2A, montre que la plupart des mutations du gène MFN2 sont des mutations faux-sens. Une trentaine de mutations du gène MFN2 ont été répertoriées et sont principalement situées à proximité ou dans le domaine GTPase et les domaines coiled-coil (Verhoeven et al., 2006). La surexpression des différents mutants du gène MFN2 dans des MEF entraîne pour la majeure partie des mutations, l'abolition de la fusion et l'agrégation des mitochondries au niveau périnucléaire (Baloh et al., 2007; Detmer and Chan, 2007).

L'Atrophie Optique Autosomique Dominante (ADOA) est une maladie caractérisée par la dégénérescence spécifique des cellules ganglionnaires de la rétine entraînant la perte des axones qui constituent le nerf optique (Carelli et al., 2009). Les symptômes de la maladie apparaissent généralement précocément durant les premières années d'existence des patients. L'ADOA présente une grande variabilité intra- et interfamiliale. Cependant, la vision de la plupart des patients se dégrade en fin de vie et près de la moitié deviennent aveugles (Cohn et al., 2008; Cohn et al., 2007; Kjer et al., 1996; Votruba et al., 1998). La plupart des patients (50-60%) possèdent une mutation du gène OPA1. Il existe cependant une atrophie optique accompagnée d'une cataracte prématurée héréditaire (ADOAC) dues à une mutation dans le gène OPA3 localisé sur le chromosome 19 qui code pour une protéine ubiquitaire dont la fonction n'est pas encore caractérisée (Reynier et al., 2004).



Plus de 200 mutations ont été identifiées à ce jour dans le gène OPA1 (eOPA1 database). Elles sont, pour une grande majorité, situées dans le domaine GTPase (Exons8-15) et dans la région centrale (Exons16-23), et correspondent à des substitutions de base (69%), des délétions (26%) ou des insertions (5%) (Ferre et al., 2005; Ferre et al., 2009). Une grande partie des mutations génère un codon stop précoce conduisant à une protéine tronquée et, par voie de conséquence, à un phénomène d'haploinsuffisance puisque seul l'allèle sauvage peut coder pour des protéines fonctionnelles (Pesch et al., 2001; Schimpf et al., 2006; Zanna et al., 2008). Cependant, 30% des patients possèdent une mutation faux-sens localisée dans le domaine catalytique GTPase qui serait susceptible d'avoir un effet dominant négatif (Amati-Bonneau et al., 2008; Ferraris et al., 2008; Hudson et al., 2008; Yu-Wai-Man et al., 2010).

Alors que l'on pensait au moment de sa découverte que les mutations d'OPA1 n'affectaient que les cellules ganglionnaires de la rétine, plus de 20% des cas ADOA-1 sont à l'heure actuelle des formes syndromiques (Amati-Bonneau et al., 2005; Amati-Bonneau et al., 2003; Liguori et al., 2008; Payne et al., 2004; Shimizu et al., 2003). Outre le nerf optique, certains patients sont atteints de pertes auditives, d'ataxie, de myopathie et de neuropathies périphériques (Mackey and Trounce, 2010; Schaaf et al., 2011; Spinazzi et al., 2008; Zeviani, 2008). Une mutation faux-sens dans le domaine GTPase d'OPA1 augmenterait par 3 le risque de développer une forme syndromique. Alors que l'effet des mutations pathogènes sur le nombre de copies du génome mitochondrial reste controversé (Kim et al., 2005; Zanna et al., 2008), les mutations d'OPA1 responsables de formes syndromiques de l'ADOA1 provoquent l'accumulation de délétions d'ADNmt au niveau des muscles squelettiques (Amati-Bonneau et al., 2008; Hudson et al., 2008; Lodi et al., 2011).

Certaines mutations de la protéine OPA1 provoquent chez des patients atteints d'ADOA-1 un défaut de synthèse de la phosphocréatine après un exercice et une réduction du niveau d'ATP *in vivo* (Lodi et al., 2004; Lodi et al., 2011). Certains patients présentent également une réduction de l'activité du complexe IV et une augmentation de celle du complexe V sans pour autant perturber la production en ATP (Chevrollier et al., 2008). D'autres études montrent dans des fibroblastes de patients une réduction de la production d'ATP conduite par le complexe I (Zanna et al., 2008). Cependant, des études effectuées sur des lymphocytes ou des biopsies musculaires de patients ne montrent aucun effet sur la phosphorylation oxydative (Mayorov et al., 2008; Spinazzi et al., 2008). L'altération de la phosphorylation oxydative comme mécanisme pathogène de l'ADOA-1 reste donc un sujet de controverse.



## I-2-6- Modèles animaux de dysfonctions de la dynamique mitochondriale

La dernière décennie a vu l'apparition de modèles génétiques qui ont permis une approche plus intégrée de la dynamique mitochondriale et qui ont ainsi mis en évidence la nécessité de ce processus pour le développement et la vie des organismes mammifères. Il existe des modèles murins transgéniques pour l'acteur de fission DRP1 et pour les acteurs de fusion MFN1 et 2 et OPA1.

L'équipe de K. Mihara a créé un modèle de souris transgénique pour le gène DRP1. Ce gène a été délété de l'exon 2 qui code une partie du site de liaison au GTP (Ishihara et al., 2009). Cette délétion est létale à l'état homozygote au stade embryonnaire entre les stades E10,5 et E12,5. Entre les stades E9,5 et 11,5, les embryons *Drp1<sup>-/-</sup>* sont plus petits, leur cœur est moins développé, le foie est atrophié et le tube neural est plus fin. Les lignées de cellules souches embryonnaires en dérivant présentent des mitochondries agrégées qui possèdent une morphologie tubulaire avec des crêtes mitochondriales qui semblent intactes. L'expression des Mitofusines est diminuée et le processing d'OPA1 est augmenté dans des lignées MEF *Drp1<sup>-/-</sup>*; ce qui pourrait traduire la mise en place d'un processus de compensation de la cellule par une diminution de l'activité de fusion mitochondriale. Les souris mutantes ne présentent pas d'augmentation de l'autophagie et le potentiel de membrane mitochondrial est comparable à celui des embryons sauvages. La respiration n'est pas affectée. L'ADN mitochondrial ne montre pas non plus de défaut. Par contre, les souris dépourvues de DRP1 présentent une élévation de l'apoptose dans le cerveau en formation mais pas dans les autres tissus. DRP1 semble indispensable au bon développement cérébral. En effet, outre l'accroissement du taux d'apoptose, les neurones *Drp1<sup>-/-</sup>* présentent une diminution du nombre de synapses et des neurites. Ce modèle murin a donc permis de mettre en évidence le rôle majeur de DRP1 dans le développement du tissu nerveux.

Une autre souris invalidée pour le gène *Drp1* au niveau du domaine GTPase, a été réalisée pour l'équipe de H. Sesaki (Wakabayashi et al., 2009). Comme la précédente, cette mutation est létale à l'état homozygote au stade embryonnaire E11,5. La mort est provoquée d'une part par un défaut de développement du placenta dont la mise en place nécessite DRP1, et d'autre part, par une insuffisance cardiaque. Les lignées MEF en découlant, présentent des défauts de division des mitochondries et des péroxysomes, et un réseau mitochondrial allongé et interconnecté. En revanche, les crêtes mitochondriales ont une organisation normale et la quantité d'ATP est identique aux contrôles. Les quantités des Mitofusines 1 et 2 sont réduites de 50% alors que celles d'OPA1 et de FIS1 sont inchangées. Une augmentation de l'apoptose se produit dans les tubes neuraux aux stades E9,5 et 10,5



dans les embryons *Drp1*<sup>-/-</sup>, mais pas, en revanche, dans les MEF *Drp1*<sup>-/-</sup>. Pour approfondir la compréhension du rôle de DRP1 dans le cerveau, cette équipe a ensuite produit une lignée de souris invalidée pour le gène DRP1 spécifiquement dans les neurones. Ces souris meurent quelques heures après la naissance et présentent une réduction du volume du cervelet qui serait due à une diminution de la prolifération des cellules de Purkinje et non pas une augmentation de l'apoptose.

L'équipe de David C Chan (Chen et al., 2003) a obtenu des souris transgéniques dans lesquelles l'inactivation des gènes MFN1 et 2 est due à l'excision d'un exon intervenant dans le domaine GTPase, ce qui empêche la formation de protéines fonctionnelles (Chen et al., 2003; Chen et al., 2007). Leurs premières études montrent également que la perte totale de fonction d'acteurs de la dynamique mitochondriale provoque la mort des embryons au stade E11,5 de développement. MFN1 et 2 ont des rôles partiellement redondants au niveau du développement du placenta (Chen et al., 2003; Chen et al., 2007). En effet, lorsque l'inactivation des MFN1 et 2 est réalisée dans les seules cellules embryonnaires mais pas dans les cellules constituant le placenta, une fraction importante des souris *Mfn2*<sup>-/-</sup> meurent après la naissance et les souris *Mfn1*<sup>-/-</sup> sont viables (Chen et al., 2007).

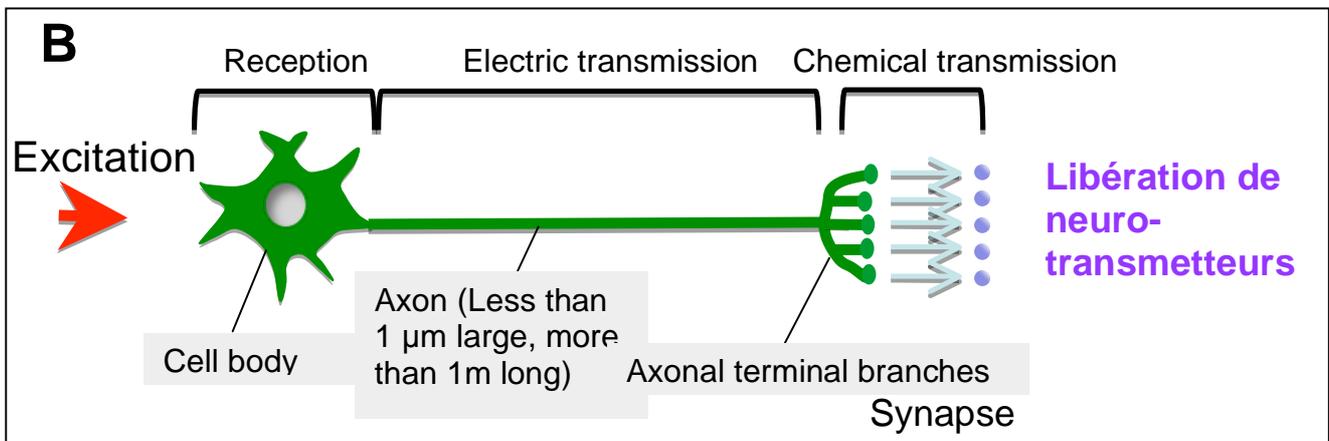
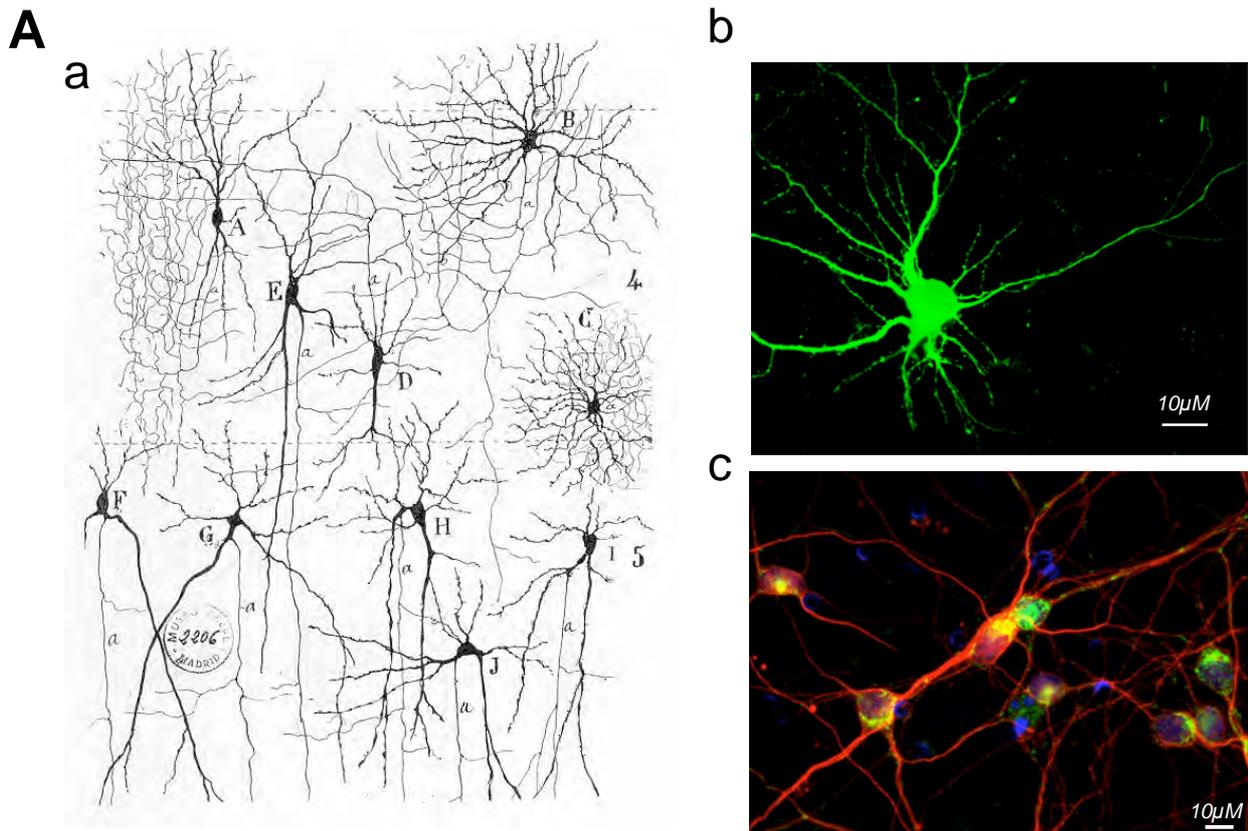
Afin de pouvoir étudier l'importance des Mitofusines sur le développement au-delà des stades embryonnaires létaux, les auteurs ont obtenu des souris transgéniques conditionnelles dans lesquelles l'inactivation des gènes MFN1 et 2 seulement dans l'embryon est obtenue au stade E7. Les souris conditionnelles MFN1 ne présentent pas de défaut particulier. En revanche, les souris conditionnelles MFN2 présentent des altérations dans le développement et le maintien de la structure cérébelleuse. Le volume global du cervelet est réduit à partir du stade post-natal P7, la structure lobée étant maintenue ainsi que l'organisation des différentes couches. Ainsi, l'altération engendrée par la perte de la protéine MFN2 ne provoque pas un défaut des mécanismes de mise en place du cervelet, mais induit la mort principalement des cellules de Purkinje.

Les cellules de Purkinje du cervelet requièrent MFN2 pour l'extension des dendrites, la mise en place de nouvelles épines dendritiques et leur survie. Les mitochondries de ces cellules cérébelleuses des souris dépourvues de la protéine MFN2 s'agrègent dans la région périnucléaire. D'autre part, la chaîne de transport des électrons est perturbée en raison d'une diminution de l'activité du complexe IV. Une petite proportion des mitochondries des muscles des souris *MFN2*<sup>-/-</sup> présentent des mutations de l'ADN mitochondrial. Cette perte de l'ADN mitochondrial est étendue à toutes les mitochondries dans des souris doubles mutantes *MFN1*<sup>-/-</sup>, *MFN2*<sup>-/-</sup> dont les muscles montrent à la fois une augmentation du nombre de mutations et du nombre de délétions par paire de bases d'ADNmt (Chen et al., 2010).



Deux modèles murins d'haploinsuffisance de la pathologie ADOA-1 présentent une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine retrouvée chez les patients mais à des stades plus précoces. En effet, les souris développent au cours de leur vie des altérations des cellules ganglionnaires de la rétine. L'équipe de Wissinger a obtenu une souris mutante au niveau d'un site d'épissage (c.1065+5G>A) du gène *Opa1*, mutation existant chez des patients (Alavi et al., 2007). Cette mutation provoque un saut de l'exon 10 durant la transcription qui génère une délétion de 27 acides aminés dans le domaine GTPase et mène à l'instabilité de la protéine mutante ne laissant que 50% de la protéine sauvage. Les souris homozygotes pour cette mutation montrent un retard de développement à E8,5 et les embryons meurent avant d'atteindre le stade embryonnaire E12,5. À 8 mois, les souris hétérozygotes *OPA1*<sup>+/-</sup> présentent des mitochondries fragmentées et des crêtes mitochondriales déstructurées dans les axones des nerfs optiques. Les souris hétérozygotes présentent une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine qui débute à 13 mois et qui est massive à 17 mois. Des défauts électrophysiologiques visualisés par l'étude des potentiels visuels évoqués ne sont détectés qu'à partir de 20 mois. Les cellules ganglionnaires de la rétine dégénèrent à partir du soma et la dégénérescence s'étend à l'axone.

Le second modèle d'haploinsuffisance de la pathologie ADOA-1 est une souris transgénique possédant une mutation non sens (Q285X) qui provoque la troncation de la partie de la protéine située au début du domaine GTPase et codée par l'exon 8 (Davies et al., 2007). Cette mutation entraîne également l'instabilité de la protéine. Les embryons homozygotes présentent au stade E9,5 un retard de croissance et meurent au stade E13,5. En revanche, les souris hétérozygotes sont viables et fertiles. Les explants de muscles des souris *Opa1*<sup>+/-</sup> montrent une augmentation des mitochondries fragmentées. La dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine débute tardivement au stade adulte vers 9 mois et atteint son maximum à 24 mois. À ce stade, le nombre d'autophagosomes est augmenté dans les souris mutées alors qu'il diminue avec l'âge dans les souris contrôles en accord avec la bibliographie (Del Roso et al., 2003). L'autophagie pourrait donc être une cause éventuelle de la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine. L'autophagie est un processus particulièrement important pour les cellules quiescentes comme les neurones (Hara et al., 2006). L'étude de coupes organotypiques de rétine révèle une atrophie de l'arborescence dendritique dès 10 mois des cellules ganglionnaires de la rétine de souris hétérozygotes mutantes alors que les effets cliniques ne se déclarent qu'à partir du 12<sup>e</sup> mois. La dendropathie touche spécifiquement les neurones ON de la sublamina b qui connectent directement le thalamus et ne touche pas les neurones OFF de la sublamina a connectés au cortex. La sublamina b de la couche interne plexiforme demande plus d'énergie et fonctionne *via* des synapses glutamatergiques des neurones bipolaires.



**Illustration 14: Les neurones, cellules hautement asymétriques et polarisées**

**A:** Illustrations de différents de types de neurones: **a)** reproduction d'e dessin de neurones de cortex cérébral par R. y Cajal, 1906; **b)** image de neurone cortical murin en culture primaire observée en microscopie de fluorescence après transfection de la GFP (Miquel et al., non publié; **c)** image de neurones corticaux murins en culture primaire après immunodétection de la protéine Map2 (rouge) et des mitochondries (vert) (Bertholet et al., non publié).

**B:** Synapse chimique: représentation schématique de la fonction des compartiments neuronaux dans la transmission de l'information par les neurotransmetteurs (tiré de documents de cours El Mestikawy & Miquel, 2010).

Alors que la sublamina a est en contact avec les cellules amacrines GABAergiques et les cellules bipolaires glutamatergiques. Les synapses GABAergiques sont moins demandeuses en énergie et agissent à une différence de potentiel proche de l'équilibre du chlore (Mattson and Magnus, 2006). Ce qui expliquerait que les neurones de la sublamina b soient plus touchés étant plus sensibles à un défaut énergétique.

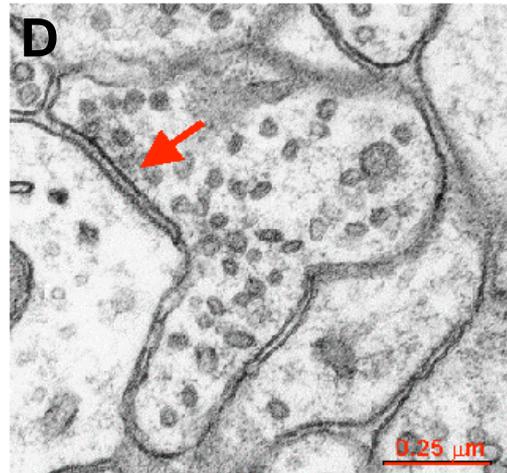
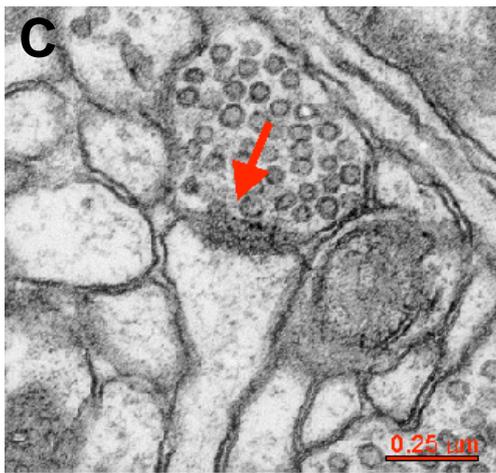
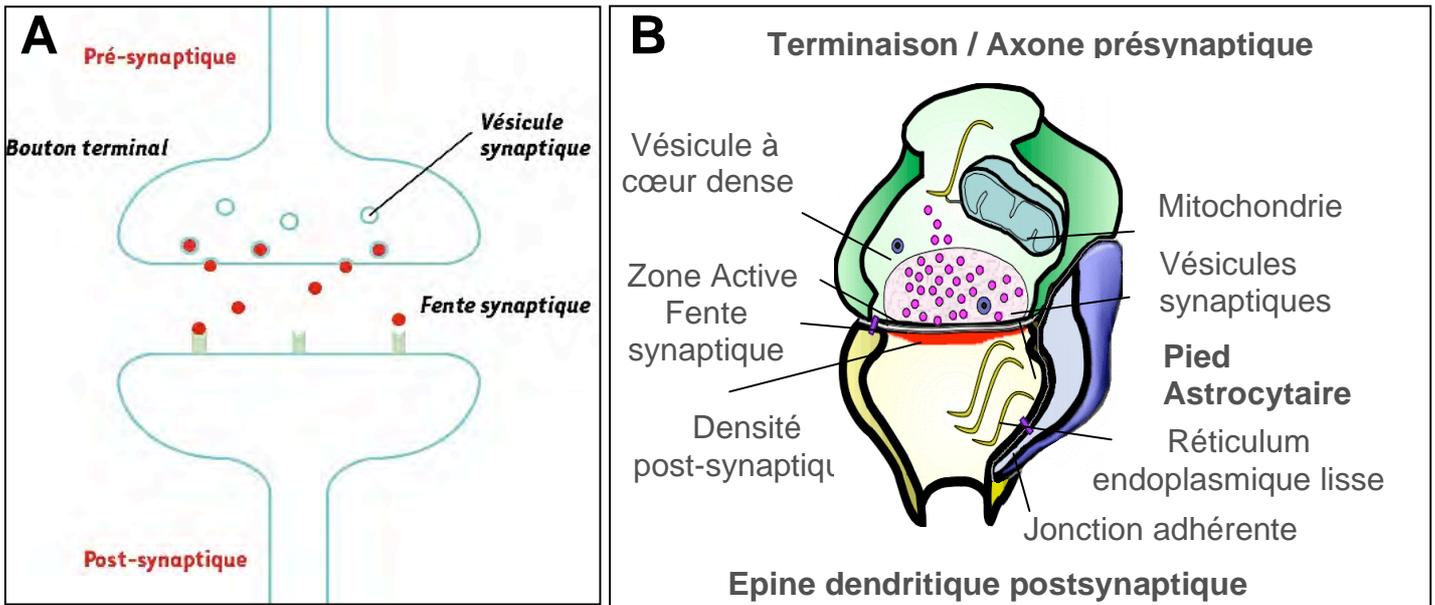
Des modèles invertébrés d'inactivation d'OPA1 ont également été développés. Les mutations de la protéine eat-3, homologue d'OPA1 chez *Caenorhabditis elegans*, provoquent une fragmentation des mitochondries et une hypersensibilité au stress oxydant sans augmentation de la mort cellulaire (Kanazawa et al., 2008). Chez la drosophile, la mutation d'OPA1 à l'état homozygote est létale au stade embryonnaire. Les mutants ont des yeux rugueux ou luisants dans des clones somatiques. Les yeux rugueux sont dus à une augmentation de l'apoptose, alors que les yeux luisants sont dus à une perte beaucoup plus tardive des cellules de cônes et de pigments sous l'action d'un stress oxydant (Yarosh et al., 2008). Des mutations du gène OPA1 à l'état hétérozygote chez la drosophile, provoquent : i) une augmentation de la production des EAOs, une sensibilité au stress oxydant, des défauts dans l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, ii) une morphologie mitochondriale aberrante dans le cœur et le muscle squelettique, iii) des dysfonctions de la vision restaurées par des traitements antioxydants et un raccourcissement de la durée de vie des mouches (Shahrestani et al., 2009; Tang et al., 2009).

Ces différents modèles transgéniques ont permis de mettre en évidence l'aspect essentiel des fonctions des acteurs qui contrôlent la dynamique mitochondriale au cours du développement et ont confirmé l'importance de ce processus au sein des neurones.

## **II. LES NEURONES : SYNAPSES ET MALADIES NEURODEGENERATIVES**

Les neurones, structures hautement spécialisées sont des cellules excitables composant l'unité fonctionnelle de base du tissu nerveux. Leur propriété d'excitabilité membranaire leur confère la capacité de répondre à des stimulations électriques et de propager une information électrique (voir illustration 14).

Les synapses sont des petites structures de moins de 1µm de diamètre, au nombre de 10<sup>15</sup> dans le cerveau humain adulte, qui jouent un rôle crucial dans la communication entre les neurones. On ne parlera ici que des synapses chimiques qui utilisent des neurotransmetteurs (Illustrations 15). Les contacts synaptiques sans continuité physique sont le résultat de l'apposition d'une terminaison pré-synaptique du neurone en amont et



### **Illustration 15: La synapse**

**A:** Représentation schématique d'une synapse. Le neurotransmetteur (NT, rouge) est stocké dans des vésicules synaptiques localisées à proximité de la membrane synaptique. Les NT sont libérés dans la fente synaptique à la suite d'une dépolarisation et viennent se fixer à leurs récepteurs transmembranaires localisés dans la membrane post-synaptique. Cette liaison active les récepteurs qui assurent alors la transmission du message (tiré de Molinari & Munnich, 2003).

**B:** Représentation schématique de la structure d'une synapse asymétrique (tirés de [www.synapse.bu.edu](http://www.synapse.bu.edu))

**C, D:** Images en microscopie électronique de synapses de système nerveux central de rat (Vergé et al., non publié).

**C,** La flèche rouge représente une synapse axo-dendritique asymétrique (type I de Gray) dans l'hippocampe, avec une densité post-synaptique prononcée (\*), et des vésicules sphériques (S).

**D,** La flèche rouge représente une synapse symétrique (type II de Gray) dans l'hippocampe, avec une très fine densité post-synaptique (\*), et des vésicules ovoïdes et irrégulières (O).

d'un élément post-synaptique situé au niveau du compartiment dendritique du neurone cible. La terminaison ou élément pré-synaptique contient des organites de petite taille appelés vésicules synaptiques qui sont remplies de molécules signal ou neurotransmetteurs. Les neurotransmetteurs sont sécrétés dans l'espace extracellulaire ou fente synaptique après une entrée massive de calcium intracellulaire par l'ouverture de canaux calciques voltage-dépendants du fait de la propagation d'un courant électrique le long de l'axone. Les neurotransmetteurs diffusent dans la fente synaptique et se fixent sur des récepteurs spécifiques de la membrane du neurone post-synaptique. La liaison de neurotransmetteurs à un récepteur provoque l'ouverture de canaux ioniques qui modifie la capacité des ions à entrer dans le neurone post-synaptique. Ceci entraîne la création de potentiels post-synaptiques traduisant un message électrique d'un neurone à l'autre. Les neurotransmetteurs doivent ensuite disparaître de l'espace inter-synaptique pour permettre l'arrêt du signal, soit par dégradation locale ou recapture des neurotransmetteurs par des transporteurs membranaires.

C'est donc le passage d'un signal électrique d'un neurone à un autre par le biais d'une communication chimique que l'on nomme la transmission synaptique. Elle est assurée principalement par (1) les synapses glutamatergiques, dites asymétriques du fait de l'existence d'une zone dense aux électrons en microscopie électronique plus élevée en post-synaptique (PSD), qui ont pour neurotransmetteur le glutamate (Illustration 15 C) et (2) des synapses GABAergiques dites symétriques associées au neurotransmetteur GABA (Illustration 15 D).

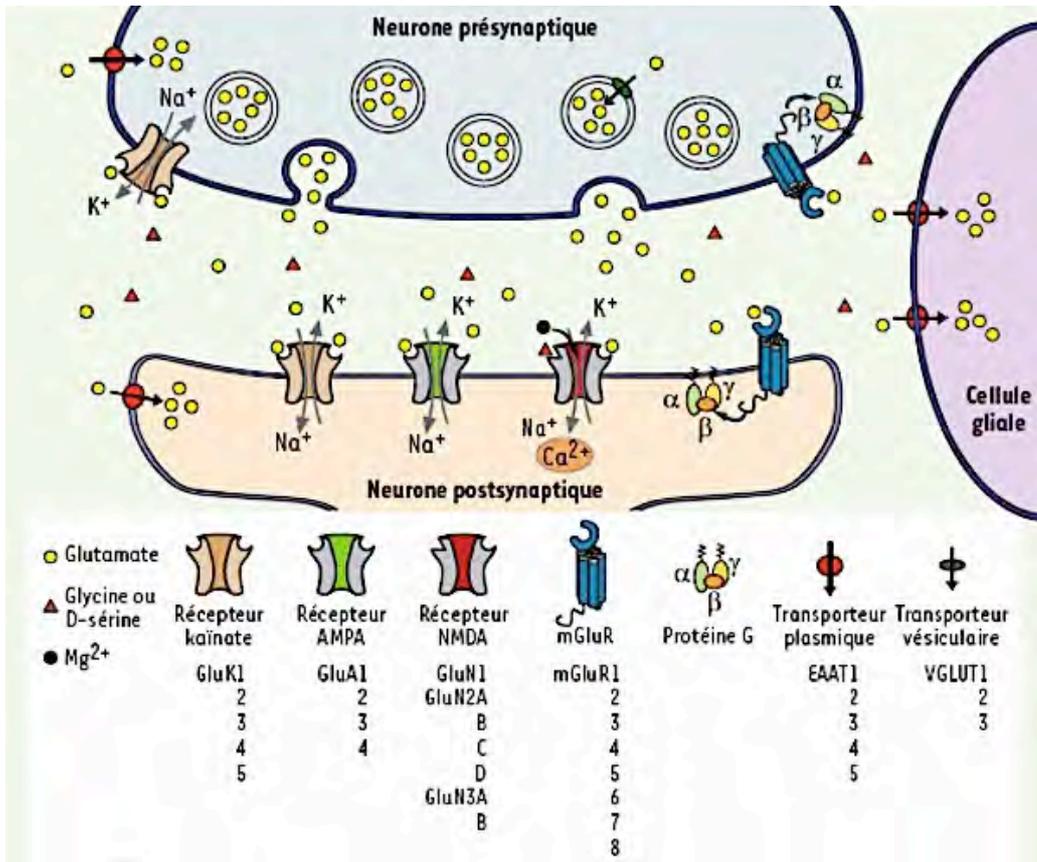
Outre celui des cellules gliales dans la régulation de la transmission, nous passerons sous silence le rôle et le mode de fonctionnement des neurotransmetteurs dits modulateurs, ainsi que la signalisation peptidergique et cannabinoïde.

En revanche, nous reviendrons brièvement sur un autre mode de communication « trans-synaptique » faisant communiquer de façon « rétrograde » les éléments du compartiment post-synaptique et ceux du compartiment pré-synaptique.

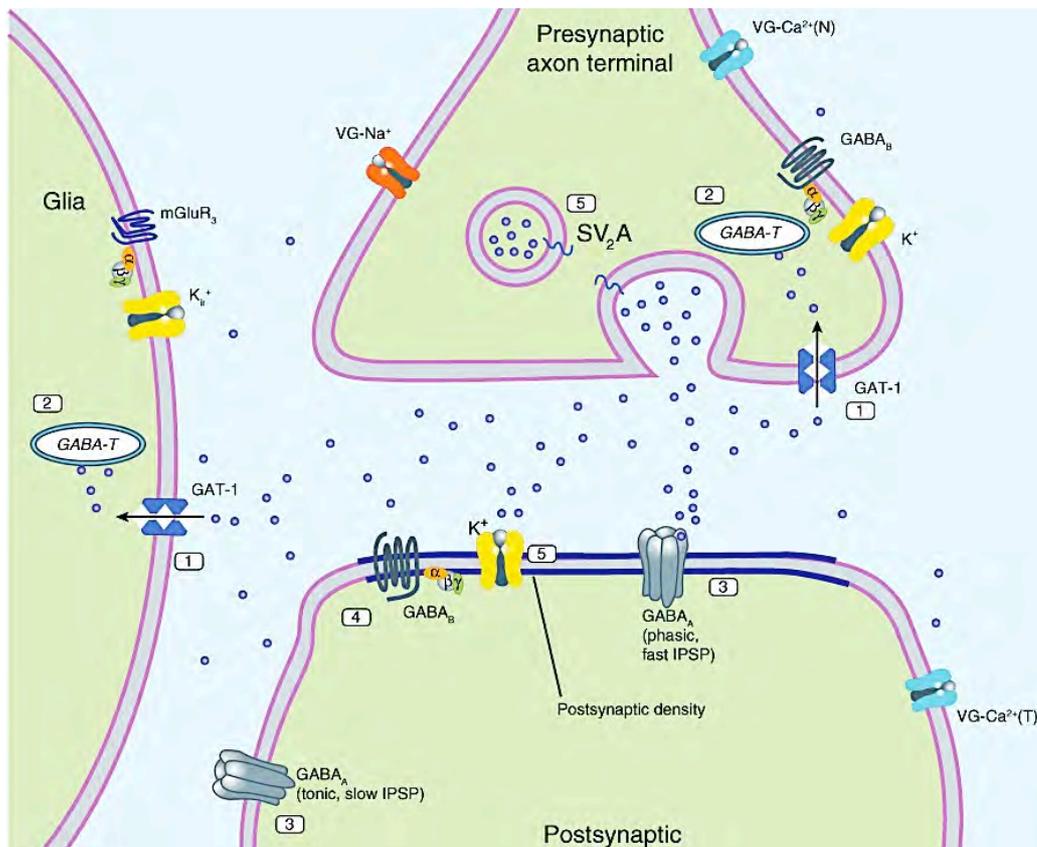
## **II-1- Transmission glutamatergique (Illustration 16 A)**

Le glutamate est le neurotransmetteur exciteur majoritaire du SNC, présent dans plus de la moitié des synapses cérébrales. Le glutamate appartient à la classe des acides aminés et est synthétisé à partir de la glutamine gliale par la glutaminase, une enzyme mitochondriale et par la transamination de l'alpha-cétoglutarate, un intermédiaire biochimique du cycle de Krebs. Une fois synthétisé dans la mitochondrie, le glutamate est stocké dans les vésicules synaptiques par l'intermédiaire de transporteurs membranaires (vGLUT1, 2 ou 3). Les deux principaux types de récepteurs du glutamate se répartissent en

**A**



**B**



**Illustration 16: Synapses glutamatergique (A) et GABAergique (B) (Gielen et al., 2010).**

Pour plus de détails, voir le texte

récepteurs ionotropiques, dont l'ouverture induit une dépolarisation membranaire à l'origine de potentiels post-synaptiques excitateurs, et de récepteurs métabotropiques intervenant dans la modulation de la transmission synaptique de type glutamatergique. La recapture du glutamate est réalisée par les transporteurs EAAT (Excitatory Amino Acid Transporter).

### II-1-1- Les récepteurs métabotropiques du glutamate

Les récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) sont des protéines transmembranaires, à sept segments hydrophobes, couplées aux protéines G hétérotrimériques (RCPG). Les mGluR sont classés en trois groupes en fonction de leur identité de séquence, de leurs caractéristiques pharmacologiques et de la voie de transduction à laquelle ils sont couplés. Le groupe 1, essentiellement localisé au niveau post-synaptique (mGluR1/5) active la phospholipase C via des protéines G de type Gq. Le groupe 2 (mGluR2/3) et le groupe 3 (mGluR4, mGluR6-8) pré-synaptiques, sont couplés négativement à l'adénylate cyclase *via* une protéine G de type Gi/Go et modulent la libération des neurotransmetteurs. Fonctionnellement, les mGluR, post-synaptiques ou pré-synaptiques, participent à physiologie neuronale et à la régulation de la transmission synaptique par le biais de divers effecteurs comme la protéine kinase C (PKC), les récepteurs à l'inositol tri-phosphate ou des canaux ioniques membranaires (Coutinho and Knopfel, 2002; Paoletti, 2011).

### II-1-2- Les récepteurs ionotropiques du glutamate

Les récepteurs ionotropiques du glutamate (iGluR) forment une famille de récepteurs canaux transmembranaires classés en fonction de leurs caractéristiques pharmacologiques et structurales. Il existe 3 familles de récepteurs nommés en fonction de leurs agonistes sélectifs de synthèse, le récepteur N-méthyl-D-aspartate, NMDA, le récepteur alpha-amino-3-hydroxy-5méthyl-4-isoxazolepropionate, AMPA, et le récepteur kaïnate. Ces récepteurs canaux sont composés de l'association tétramérique de sous-unités protéiques dont le grand répertoire offre un grand nombre d'isoformes de récepteurs. Ces canaux permettent principalement le passage de cations de façon non sélective, principalement de cations sodiques et potassiques et de faibles quantités d'ions calcium (Burnashev, 1996; Magleby, 2004). Malgré leur diversité phylogénétique, toutes les sous-unités des iGluR partagent une structure commune. Chaque sous-unité possède un site de fixation pour l'agoniste, une partie du pore, et un domaine C-terminal cytosolique qui permet des interactions avec des protéines partenaires. On retrouve ces récepteurs canaux principalement au niveau de



l'élément post-synaptique ancrés dans la PSD, l'échafaudage mutiprotéique étant couplé au cytosquelette.

*-Les récepteurs NMDA (NMDAR) :*

Les NMDAR sont constitués des sous-unités GluN1, GluN2 et, de découverte plus récente, GluN3 (anciennement NR1, NR2A à D et NR3A/B) qui s'assemblent généralement de manière hétérotétramérique. Les GluN1 sont codés par un seul gène qui génère huit variants d'épissage ; les 4 GluN2 sont codés par 4 gènes distincts et les GluN3 par deux gènes différents. La grande variété de sous-unités et de combinaisons d'assemblage génère une multiplicité de récepteurs NMDA fonctionnellement différents (Paoletti, 2011). Bien qu'ubiquitaires, la localisation cérébrale des NMDAR varie selon le stade de développement. De façon générale, ils sont localisés principalement au niveau post-synaptique ancré à la PSD mais on les retrouve aussi au niveau peri-synaptique, en extra-synaptique et dans des sites pré-synaptiques où ils influencent la libération des neurotransmetteurs (Bidoret et al., 2009; Brickley et al., 2003; Harris and Pettit, 2007; Petralia et al., 2010; Thomas et al., 2006). Les NMDAR sont présents sur les neurones mais également sur les cellules gliales dont les prolongements des oligodendrocytes responsables de la myélinisation. Qu'ils soient pré- ou post-synaptiques, les récepteurs NMDA participent à l'intégration du signal exciteur. Le fonctionnement du récepteur NMDA nécessite que les 4 sites agonistes situés sur les sous-unités GluN2/NR2 soient occupés par le glutamate. Son activation requiert également la présence du co-agoniste glycine (ou D-serine) dont le site de fixation est localisé sur la sous-unité GluN1/NR1. Les NMDAR montrent des cinétiques d'activation et de désactivation particulièrement lentes par rapport aux autres récepteurs du glutamate de type kaïnate et AMPAR. Au potentiel de repos du neurone, la liaison du glutamate sur le récepteur de type NMDA ne suffit pas pour permettre l'entrée d'ion par le canal. Une dépolarisation de la membrane plasmique aux alentours de -40 mV, induite notamment par les récepteurs AMPA, permet la levée du blocage voltage-dépendant du canal par l'ion magnésium (Nowak et al., 1984). Cette propriété place les récepteurs NMDAR au centre de la potentialisation à long terme (Harris et al., 1984).

*-Les récepteurs AMPA (AMPA):*

Les sous-unités des récepteurs AMPAR (classiquement dénommées de GluR1 à 4, modifiées en GluA1 à 4) sont codées par quatre gènes et forment des homomères ou des hétéromères (Santos et al., 2009). Les AMPAR, qui possèdent des cinétiques d'activation et de désactivation rapides, sont les acteurs majeurs de la transmission synaptique rapide. De plus, dans des conditions physiologiques, les AMPAR sont des entités mobiles qui se déplacent constamment entre les synapses et les différents stocks pour permettre un



nombre constant d'AMPA aux synapses (Choquet and Triller, 2003; Triller and Choquet, 2008). Les AMPAR sont recrutés au cours de l'activité synaptique, à partir d'un stock vésiculaire intracellulaire par exocytose ou par diffusion latérale de sites extra-synaptiques. Le nombre de récepteurs de type AMPA présents dans la densité post-synaptique détermine en partie le poids de la transmission synaptique. L'insertion des AMPAR dans la PSD est un des mécanismes de la potentialisation à long terme (Shi et al., 1999). Les AMPAR ne sont pas seulement post-synaptiques, ces récepteurs régulent la libération de neurotransmetteurs au niveau des terminaisons GABAergiques (Bureau and Mulle, 1998). Ainsi, comme les récepteurs de type NMDA, la distribution subcellulaire et les interactions protéiques des récepteurs de type AMPA sont des éléments essentiels pour la régulation fine de la transmission synaptique par le glutamate. Enfin, il faut noter que les AMPAR sont le plus souvent fonctionnellement associés à des Transmembrane AMPA receptor Regulatory Proteins (TARP) qui se comportent comme des sous-unités auxiliaires jouant un rôle important dans la régulation et l'adressage de ces récepteurs. Les récepteurs ionotropiques du glutamate ayant des structures proches, il est de plus en plus probable que de telles protéines auxiliaires modulent le fonctionnement de la plupart d'entre eux, rendant ainsi encore plus complexes leurs mécanismes de régulation (Jackson and Nicoll, 2011).

*-Les récepteurs de type kaïnate :*

Les récepteurs kaïnate sont des homomères ou des hétéromères composés des sous-unités GluR5 à 7 et de KA1/KA2. Ces récepteurs permettent le passage des ions sodium et potassium et pour certains des ions calcium. Ils sont distribués dans tout le cerveau et jouent essentiellement le rôle de modulateurs de la transmission synaptique et de l'excitabilité neuronale. Cette classe de récepteur intervient dans la régulation de l'activité des réseaux synaptiques en facilitant la dépolarisation des éléments post-synaptiques, la modulation de la transmission excitatrice et inhibitrice en facilitant la libération des neurotransmetteurs, l'affinement de la force synaptique au cours du développement et la potentialisation de l'excitabilité neuronale. Ils influencent aussi l'équilibre entre l'excitation et l'inhibition dans les réseaux neuronaux (Contractor et al., 2011; Contractor et al., 2001; Mulle et al., 2000; Rodriguez-Moreno et al., 1997; Schmitz et al., 2000).

## **II-2- Transmission GABAergique (Illustration 16 B)**

Le GABA ou acide gamma-aminobutyrique est le neurotransmetteur inhibiteur majoritaire du SNC. Le GABA serait impliqué dans au moins 30% des synapses du cerveau. Le GABA est synthétisé dans le cytoplasme à partir du glutamate par décarboxylation grâce aux enzymes GAD-65 et 67 (Glutamate-décarboxylase). La GAD-65 possède une



localisation principalement axonale notamment au niveau des terminaisons nerveuses, contrairement à GAD-67 dont la distribution est plus large. Une fois synthétisé, le GABA est stocké dans les vésicules pré-synaptiques par l'intermédiaire du transporteur VGAT (McIntire et al., 1997). Deux classes de récepteurs permettent la transduction du signal GABA : les récepteurs métabotropiques GABA-B et les récepteurs ionotropiques GABA-A qui sont perméables aux ions chlores. Une troisième classe de récepteurs GABA, insensibles au baclofen et à la bicuculline, pourrait constituer une population minoritaire, GABAC, apparemment restreinte à une sous-population de neurones rétiniens (Bormann, 2000). Le GABA est recapté par les transporteurs GAT1 à GAT4, neuronaux, mais également gliaux.

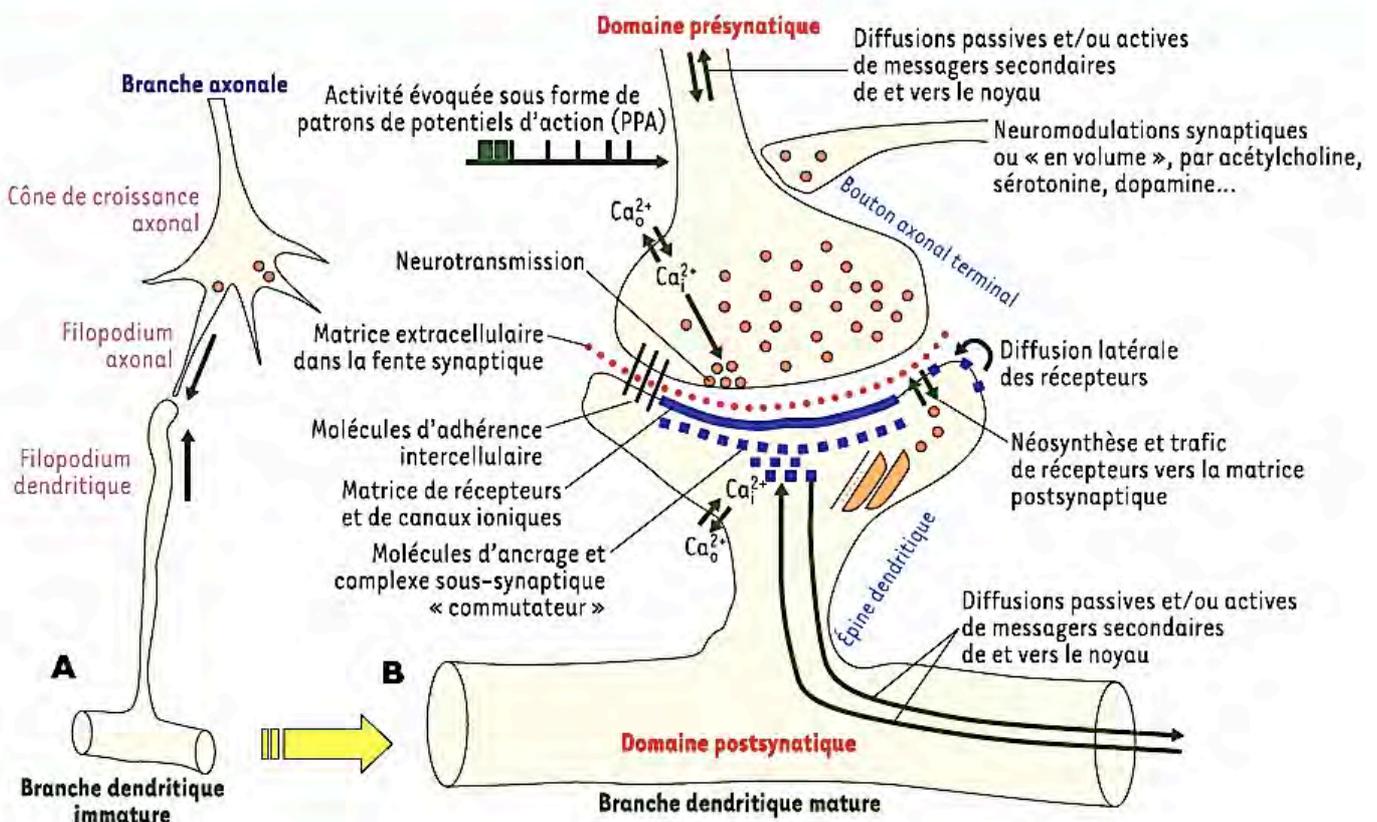
Une précision intéressante au regard de notre étude est que la signalisation GABA dans le néocortex représente une forme précoce de communication neurale, qui précède et promeut la formation des synapses glutamatergiques (Ben-Ari and Spitzer, 2004; Hennou et al., 2002; Tyzio et al., 1999).

#### II-2-1- Les récepteurs métabotropiques GABA-B

Les récepteurs GABA-B sont localisés au niveau des éléments pré- et post-synaptiques. Les récepteurs post-synaptiques sont couplés majoritairement à des canaux potassiques qui favorisent l'efflux d'ions potassium et entraînent une hyperpolarisation des neurones post-synaptiques (McCormick, 1989). La population pré-synaptique est préférentiellement associée à des canaux calciques et bloque l'entrée du calcium via l'activation de l'adénylate cyclase et régule l'exocytose des neurotransmetteurs (Strock and Diverse-Pierluissi, 2004).

#### II-2-2- Les récepteurs ionotropiques GABA-A

Les récepteurs ionotropiques GABA-A sont des canaux perméables aux ions chlores. Les récepteurs GABA-A sont des canaux chloriques hétéropentamériques composés de 19 classes de sous-unités, chacune encodée par un gène propre, groupées en 8 sous-classes en fonction de l'identité de séquence :  $\alpha$ 1-6,  $\beta$ 1-3,  $\gamma$ 1-3,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$ ,  $\pi$ ,  $\rho$ 1-3 ; dont les différentes combinaisons, auxquelles s'ajoutent les variants d'épissage, génèrent des sous-types de récepteurs fonctionnellement distincts (Luscher et al., 2011; Michels and Moss, 2007). Les récepteurs GABA-A sont principalement composés de 2 sous-unités alpha, 2 sous-unités beta et la sous-unité gamma2. Dans le cerveau mature, les GABA-A sont principalement localisés au niveau post-synaptique et au niveau extra-synaptique. Les récepteurs sont ancrés au niveau post-synaptique entre autres grâce à une protéine d'échafaudage, la Géphyrine (Tretter et al., 2008). Il est à noter que la régulation de la transmission synaptique



**Illustration 17: Synaptogenèse et maturation neuronale (tiré de Bourgeois et al., 2005).**

Représentation schématique des synapses immatures et matures.

**A:** La protosynapse est une des formes intermédiaires, immatures et labiles, de la synapse. Au début de la synaptogenèse, les filopodiums axonaux et dendritiques, très riches en cytosquelette d'actine, sont très mobiles et explorent, palpent leur environnement tissulaire jusqu'à la rencontre d'un partenaire neuronal cytocompatible. Lorsque cela arrive, la protosynapse se stabilise et s'agrandit en 45 à 60 minutes, par assemblage de nombreuses molécules d'adhérence intercellulaire, de récepteurs ionotropiques et métabotropiques, de multiples canaux ioniques, et par échanges de facteurs trophiques diffusibles.

**B:** La synapse mature est formée de deux domaines neuronaux pré- et postsynaptiques séparés par l'espace extracellulaire de la fente synaptique. Dans chaque domaine, de grands assemblages protéiques fonctionnent comme des commutateurs moléculaires, basculant la transmission synaptique vers divers niveaux d'efficacité [29].

Les mêmes mécanismes moléculaires sont à l'oeuvre dans les synapses matures et immatures, mais, dans ces dernières, le cytosquelette en plein développement est beaucoup plus modulable, jusque dans les arbres axonaux et dendritiques. Les interactions entre les états fonctionnels des synapses et les niveaux d'activation des gènes se font par de multiples cascades de signaux importés de et exportés vers le génome (doubles flèches).

inhibitrice fait appel au contrôle de l'adressage et du transport entre domaines membranaires des GABA-A-R par plusieurs voies de signalisation, que nous ne pouvons évoquer ici.

Une précision notable illustrant un fonctionnement différentiel de ces récepteurs réside dans le fait qu'au stade embryonnaire, le GABA a une fonction dépolarisante excitatrice qui se fait par des efflux des ions chlore au travers des canaux ionotropiques GABA-A (Ben-Ari and Spitzer, 2004; Hennou et al., 2002; Tyzio et al., 1999). Au cours de la période post-natale, l'augmentation d'expression du transporteur chlorure KCC2 conduit à la sortie des ions chlore intracellulaire et le GABA assume son rôle classique de neurotransmetteur inhibiteur (Ben-Ari and Spitzer, 2004; Rivera et al., 1999)

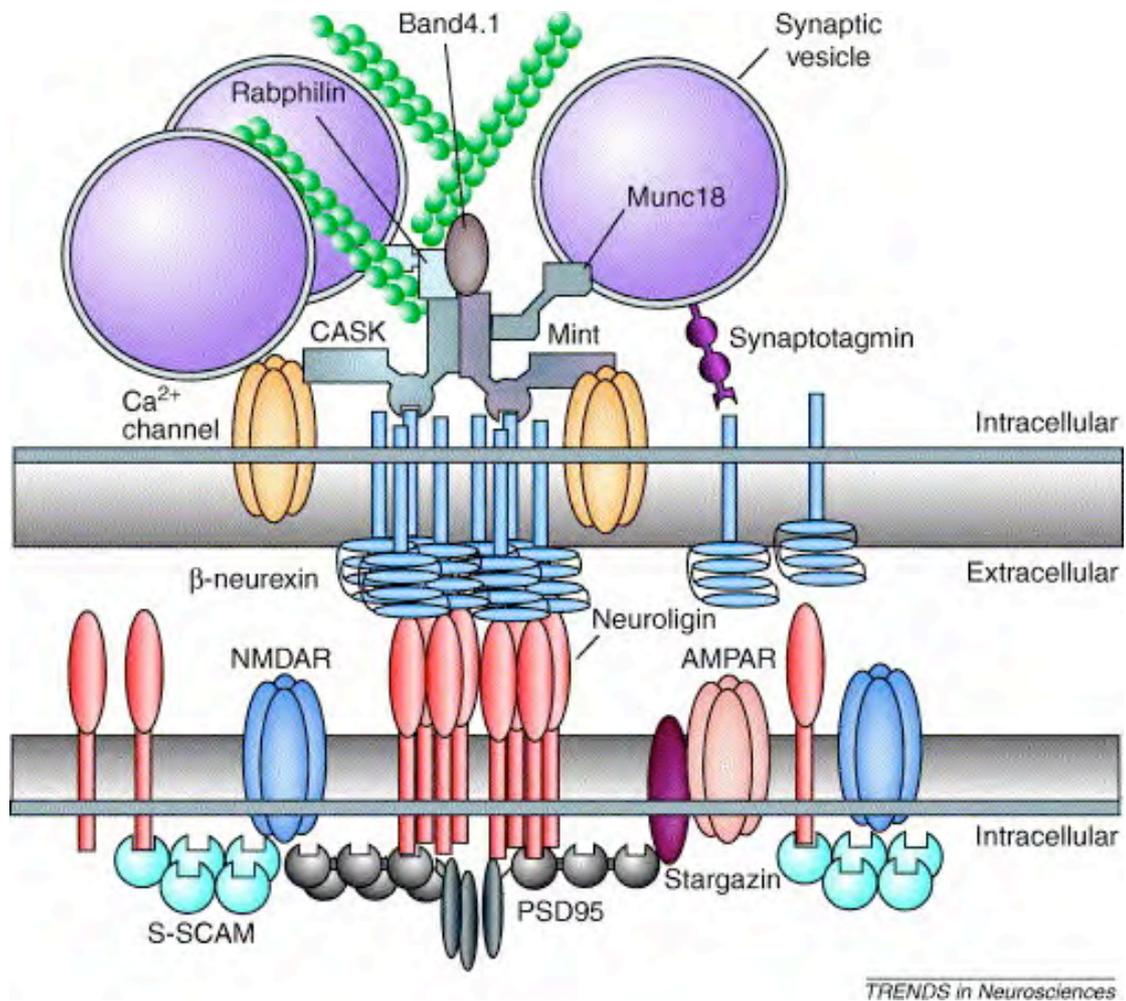
### **II-3- Synaptogenèse et maturation neuronale (Illustration 17)**

La synaptogenèse consiste en une série d'étapes comprenant la stabilisation des contacts initiaux axodendritiques, le recrutement de précurseurs protéiques pré- et post-synaptiques, la maturation des synapses et la régulation de leur nombre en fonction de l'activité.

Les synapses sont formées au niveau du filopode dendritique et des tubes dendritiques (Illustration 17A), plus tard elles se localisent au niveau des épines dendritiques (Fiala et al., 1998; Okabe et al., 2001; Ziv and Smith, 1996). Après un assemblage initial rapide, le développement d'une synapse mature s'accompagne d'une modification de leur ultrastructure et de l'acquisition de propriétés électrophysiologiques (Chavis and Westbrook, 2001; Liu et al., 1999; Mohrmann et al., 2003).

Les synapses s'assemblent sur une période prolongée de développement cérébral (McAllister, 2007). En effet, un neurone possède simultanément des synapses âgées de quelques heures, de quelques jours et de quelques mois.

La formation des synapses nécessite la synthèse et le transport des molécules qui constitueront les éléments pré- et post-synaptiques, aux sites de contact entre les axones et les dendrites. Une fois que les axones et les dendrites trouvent leurs cibles, les molécules d'adhérence trans-synaptiques se lient entre elles de part et d'autre de la fente synaptique (Illustration 17B). Ces molécules comportent des membres des immunoglobulines comme les NCAM, les nectines, les neuroligines, les SynCAM, les pentraxines neuronales et les éphrines (Akins and Biederer, 2006; Scheiffele, 2003; Waites et al., 2005). En ce qui concerne les synapses glutamatergiques, les protéines membranaires des vésicules synaptiques influencent leur propre localisation au niveau de l'élément pré-synaptique (Sudhof, 2004). Au niveau de l'élément post-synaptique, les récepteurs et les canaux ioniques sont attachés à la densité post-synaptique (PSD) par des interactions avec des protéines d'échafaudage qui jouent un rôle dans le trafic des récepteurs, dans la



**Illustration 18: Liens entre compartiments pré et post-synaptiques** (Tiré de Dean & Dresbach, 2006).

Ce schéma illustre les interactions moléculaires trans-synaptiques impliquant les neuroigin- $\beta$ -neurexin et démontre la continuité entre les éléments pré-synaptiques, incluant les vésicules de neurotransmetteurs, et les éléments post-synaptiques, incluant les récepteurs ionotropiques de type glutamatergique

transmission synaptique et sa plasticité (Kennedy, 2000; Kim and Sheng, 2004; Montgomery and Madison, 2004).

De manière générale pour tous les types de synapses, les neurotransmetteurs et l'activité synaptique régulent les étapes de formation de la synapse, la plasticité et le développement des axones et des dendrites (Bonhoeffer and Yuste, 2002; Carroll et al., 1999; Hua et al., 2005; Malinow and Malenka, 2002; Ruthazer et al., 2003; Shi et al., 1999; Tashiro et al., 2003; Wong and Wong, 2001; Zheng et al., 1994).

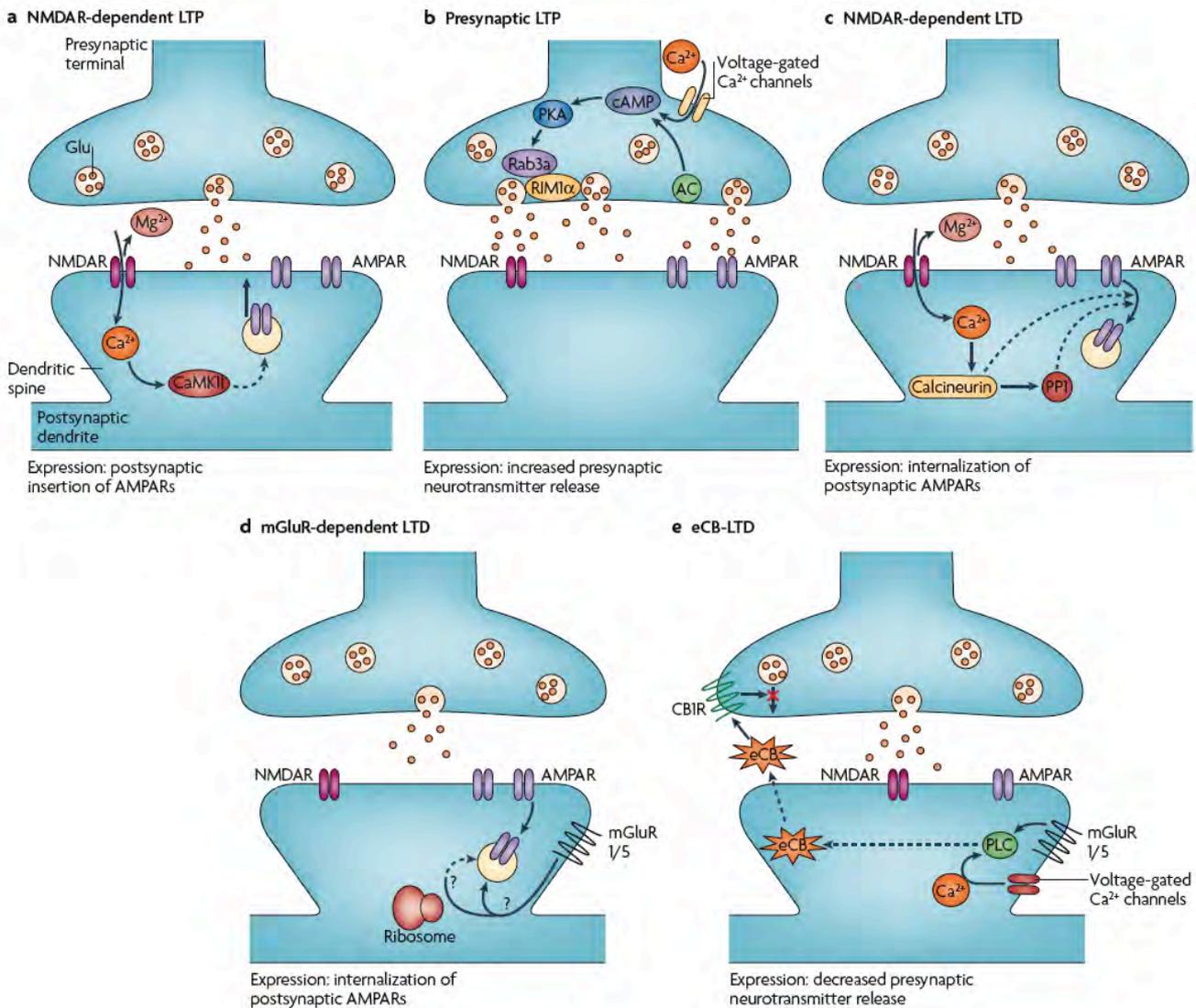
De façon générale, comme le rappelait JP Bourgeois, l'ensemble des ajustements morfo-fonctionnels des contacts synaptiques induits par l'environnement s'inscrit dans une fenêtre de variabilité contrôlée par les réseaux de gènes sélectionnés pendant le développement cérébral. Ce phénomène d'épigenèse synaptique revêt une importance particulière lors de périodes cruciales du développement (Bourgeois, 2005).

#### **II-4- Interactions entre compartiments pré et post-synaptiques (Illustration 18)**

Ainsi que nous venons de le décrire, la structure des deux compartiments pré et post-synaptiques s'appuie sur l'existence de protéines d'échafaudage entourant les protéines structurales, aux côtés des molécules auxiliaires précédemment évoquées de type « Transmembrane AMPA receptor Regulatory Proteins » comme la stargazine.

Comme le montre l'illustration 18, des connexions moléculaires relient non seulement les éléments de chaque compartiment, mais également les compartiments entre eux grâce en particulier aux molécules de type beta-neurexin et neuroligine dont les domaines extra-cellulaires se situent dans l'espace inter-synaptique où ils peuvent être en contact. Comme le rappellent Dean & Dresbach, ces phénomènes sont généralisés aux synapses entre neurones dissociés en culture (Dean and Dresbach, 2006), ce qui nous permettra en temps utiles d'éclairer nos résultats. En effet, les variations d'expression de ces molécules d'adhérence synaptique de type beta-neurexin et neuroligine peuvent entraîner des modifications de fréquence et/ou d'amplitude des courants post-synaptiques (Chih et al., 2005; Levinson and El-Husseini, 2005).

Une conséquence, récemment mise en évidence, de cette organisation est la modulation rétrograde du fonctionnement pré-synaptique par des changements moléculaires au niveau post-synaptique. Ainsi, la probabilité de libération du glutamate est modifiée par une voie de signalisation faisant intervenir le « couple » PSD95 et neuroligine (Futai et al., 2007), couple par ailleurs impliqué dans la régulation de l'équilibre entre synapses excitatrices et inhibitrices (Prange et al., 2004). Un autre élément post-synaptique fondamental des synapses excitatrices susceptible de déclencher un signal influençant la maturation pré-synaptique est constitué par les récepteurs AMPA. Ainsi, les AMPAR, outre



**Illustration 19: La potentialisation et la dépression à long terme (tiré de Kauer & Malenka, 2007)**

Schéma simplifié des mécanismes d'induction et d'expression des formes de plasticité synaptique à long terme observés chez le rongeur.

**a** - L'induction de la LTP dépendante des récepteurs NMDA nécessite l'activation post-synaptique des récepteurs NMDA et de la CaMKII. L'insertion de récepteurs AMPA à la membrane post-synaptique est un des mécanismes majeurs de l'expression de cette forme de LTP.

**b** - La LTP pré-synaptique est présente aux synapses FM/CA3 et dans le cervelet. L'entrée pré-synaptique de Ca<sup>2+</sup> active des cascades de signalisation intracellulaires qui aboutissent à une augmentation durable de la libération des neurotransmetteurs.

**c** - La LTD dépendante des récepteurs NMDA est déclenchée par l'entrée post-synaptique de Ca<sup>2+</sup> via les récepteurs NMDA. Son expression est principalement soutenue par l'internalisation des récepteurs AMPA et une «downregulation» des récepteurs NMDA.

**d** - La LTD dépendante des récepteurs métabotropiques au glutamate est présente dans l'hippocampe et le cervelet. L'activation des récepteurs post)synaptiques mGluR1/5 provoque l'internalisation des récepteurs AMPA et semble nécessiter une synthèse protéique.

**e** - La LTD dépendante des cannabinoïdes endogènes est de découverte plus récente. L'activation des récepteurs mGluR1/5 post-synaptiques et/ou une augmentation du Ca<sup>2+</sup> intracellulaire active la synthèse d'endocannabinoïdes. Une fois libérés ils vont agir de façon rétrograde sur leurs récepteurs pré-synaptiques CB1, une activation prolongée qui va diminuer la libération des neurotransmetteurs.

leur rôle de régulation de la transmission synaptique *via* l'organisation de l'élément post-synaptique, ont un pouvoir de signalisation rétrograde trans-synaptique influençant l'efficacité de la transmission au niveau pré-synaptique (Tracy et al., 2011).

## **II-5- Plasticité synaptique : potentialisation et dépression à long terme**

Les synapses sont capables de s'adapter à l'activité synaptique. En d'autres termes, plus la synapse est sollicitée, plus elle sera soumise à des modifications morphologiques et de composition protéique. Ce processus de plasticité synaptique module la force d'une connexion synaptique. La plupart des études sur la plasticité synaptique portent sur la potentialisation à long terme (LTP) et la dépression à long terme (LTD) (Illustration 19). Ces processus existent à la fois pour les synapses excitatrices et pour les synapses inhibitrices. La LTP permettrait le stockage des informations alors que la LTD serait une sorte de mécanisme d'oubli (Dudek and Bear, 1992).

Il existe différents types de LTP.

La « LTP-dépendant des récepteurs NMDA » (Illustration 19a), d'abord observée dans l'hippocampe, est la forme la plus étudiée des potentialisations dans le cerveau des mammifères (Kauer and Malenka, 2007; Malenka and Bear, 2004). Elle nécessite l'activation des NMDAR par le glutamate pré-synaptique (libéré lorsque l'ion magnésium est désolidarisé du récepteur). Ceci permet l'entrée du calcium au niveau des épines dendritiques (élément post-synaptique). L'augmentation de la concentration calcique est un facteur crucial pour la LTP car elle active les cascades de signalisation intracellulaire qui comprennent plusieurs protéines kinases. Le principal mécanisme qui permet d'accroître la force synaptique est une élévation du nombre de récepteurs AMPA dans la membrane plasmique post-synaptique (Malenka and Nicoll, 1999). En quelques heures, le maintien de la LTP s'accompagne d'une synthèse protéique (Lynch, 2004) et d'un élargissement des épines dendritiques (Matsuzaki et al., 2004; Yuste and Bonhoeffer, 2001). Une modification du trafic ou du nombre de NMDAR au niveau des synapses pourrait également modifier le seuil d'induction de la LTP dépendante des NMDAR.

La LTP intervient aussi au niveau pré-synaptique (Malenka and Bear, 2004; Nicoll and Schmitz, 2005). Cette forme de LTP ne nécessite pas les NMDAR (Illustration 19b). Les facteurs post-synaptiques ne seraient eux non plus pas nécessaires, bien que ceci reste controversé (Contractor et al., 2002; Yeckel et al., 1999). La LTP pré-synaptique semble être initiée par une hausse de calcium intracellulaire due à une forte activité des terminaisons pré-synaptiques. L'élévation intracellulaire de cet ion active l'adénylate cyclase qui produit de l'AMP cyclique, mène à l'activation de la protéine kinase A (PKA)



(Malenka and Bear, 2004; Nicoll and Schmitz, 2005), et conduit finalement à une augmentation de la quantité de glutamate libéré.

La dépression à long terme « LTD-dépendant des NMDAR » (Illustration 19c), est due à l'élimination des AMPAR synaptiques par endocytose (Carroll et al., 2001). Les NMDAR sont également diminués mais par des mécanismes distincts (Morishita et al., 2005; Selig et al., 1995).

Il existe également une « LTD-dépendante des récepteurs métabotropiques du glutamate » (Illustration 19d). L'activation des récepteurs métabotropiques du glutamate (mGluR) peut aussi conduire à une LTD post-synaptique.

Il existe d'autre part, une LTD dépendante de la voie endocannabinoïde (Illustration 19e). L'activation des synapses glutamatergiques et GABAergiques peut entraîner un influx calcique bref mais intense au niveau post-synaptique qui induirait la synthèse des endocannabinoïdes. Ce sont des molécules lipophiles qui voyagent par voie rétrograde à travers la synapse pour se lier aux récepteurs CB1 pré-synaptiques et transitoirement diminuent la libération des neurotransmetteurs (Wilson and Nicoll, 2002).

En plus des mécanismes de LTP et de LTD, qui sont généralement localisés au niveau des synapses, la force synaptique peut être modifiée par des périodes prolongées d'activité synaptique. Plus précisément, des baisses prolongées d'activité augmenteraient la force synaptique. Inversement, les augmentations prolongées de l'activité synaptique l'abaissent (Turrigiano and Nelson, 2004). Ceci serait dû à des réponses homéostatiques qui maintiennent l'activité des cellules individuelles pour compenser les différences relatives des forces synaptiques, causée par la LTP et LTD.

## **II-6- Maladies neurodégénératives**

La dernière décennie de recherche a révélé l'implication de perturbations de la qualité des contrôles cellulaires (stress du RE, défaut du protéasome et d'autophagie, agrégation de protéines), du stress oxydant, de la neuro-inflammation de la perturbation du trafic cellulaire, mais également des dysfonctions mitochondriales dans l'étiologie des maladies neurodégénératives. Plus de 100 gènes sont impliqués dans des maladies neurodégénératives (AD, Parkinson, ALS, CMT, ADOA-1, Huntington, ataxies spinocérébelleuses, hereditary spastic paraparesis). Une proportion non négligeable, 23%, des gènes pouvant causer des formes génétiques de maladies neurodégénératives, codent des protéines mitochondriales alors qu'ils ne représentent que 8% des gènes nucléaires



(Schon and Przedborski, 2011). Les mitochondries constituent donc un élément majeur dans l'étiologie des maladies neurodégénératives. Plus particulièrement, des travaux ont révélé l'impact de la dynamique mitochondriale dans les processus neurodégénératifs.

Les maladies neurodégénératives sont principalement dues au vieillissement. Des pathologies comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson ou la sclérose latérale amyotrophique sont pour la plupart des cas, des maladies sporadiques. Il y a cependant pour toutes ces maladies, une proportion faible mais réelle de cas génétiques.

La maladie d'Alzheimer et la maladie de Parkinson étant les maladies les plus répandues et qui présentent de forts impacts sur les fonctions et la dynamique mitochondriales, nous avons choisi de les décrire. De plus, nous trouvons intéressant de décrire la maladie de Huntington. En effet, cette pathologie qui cause également des troubles mitochondriaux, fait partie des maladies neurodégénératives purement génétiques.

#### II-6-1- Maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer est la forme la plus connue des démences. Souvent diagnostiquée à 65 ans par des déficits mnésiques, elle peut apparaître plus tôt. Cette pathologie se caractérise entre autres par une dégénérescence neuronale dans le cortex cérébral se traduisant notamment par une atrophie des lobes pariétaux, temporaux, du cortex frontal et du gyrus cingulaire. À l'échelle cellulaire, la maladie d'Alzheimer se caractérise par une accumulation progressive de plaques séniles majoritairement au niveau extracellulaire (accumulation du peptide  $\beta$ -amyloïde) et des enchevêtrements neurofibrillaires (agrégats de la protéine Tau associés aux microtubules).

Le stress oxydant est impliqué dans les phases précoces de la maladie (Bogdanovic et al., 2001; Gibson et al., 1998; Pratico et al., 2001). De plus, les patients atteints de la maladie d'Alzheimer présentent un métabolisme énergétique diminué dans les lobes frontaux et pariétaux et une réduction de la quantité de certaines enzymes mitochondriales (Blass, 2001; Castellani et al., 2002).

Le peptide  $\beta$ -amyloïde est un des facteurs responsables de la maladie d'Alzheimer. Son précurseur APP (Amyloid Precursor Protein) subit un premier clivage erroné par la  $\beta$ -sécrétase. Le peptide intermédiaire en découlant, est à son tour clivé par la  $\gamma$ -sécrétase (Thinakaran and Koo, 2008). Les plaques amyloïdes provenant de l'agrégation du peptide  $\beta$ -amyloïde sont probablement neurotoxiques et se situent majoritairement dans le milieu extracellulaire. Cependant, une faible fraction du peptide  $\beta$ -amyloïde s'accumule dans les différents compartiments de la cellule (Greenfield et al., 1999; Manczak et al., 2006). Or les formes solubles de ce peptide, sont censées être plus neurotoxiques que les plaques. Ce



peptide est notamment retrouvé au niveau des crêtes mitochondriales par translocation du peptide *via* le complexe d'import TOM de la mitochondrie (Hansson Petersen et al., 2008; Manczak et al., 2006). Une partie de la  $\gamma$ -sécrétase est également associée à la mitochondrie (Hansson et al., 2004).

Les mitochondries ont depuis longtemps été impliquées dans l'apparition des formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer en raison d'une diminution de la production de l'ATP mitochondrial, d'une production trop importante des EAOs et de l'incidence de la mort par apoptose mitochondriale (Zhu et al., 2004). De plus, le peptide  $\beta$ -amyloïde provoque, par encombrement du système d'import des mitochondries, des dysfonctions mitochondriales notamment par diminution de la respiration mitochondriale et de la quantité de la pyruvate déshydrogénase (Yao et al., 2009). Ce peptide induit également un stress oxydatif en se liant directement au cytochrome c et à l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase, une enzyme du cycle de Krebs (Crouch et al., 2005; Devi et al., 2006; Lustbader et al., 2004; Reddy et al., 2004; Rui et al., 2006; Yao et al., 2009). Des mutations particulières de l'ADNmt ont été retrouvées dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer et présentent près de 70% d'hétéroplasmie (Coskun et al., 2004; Wallace, 1997). De plus, ces patients présentent une réduction de la quantité d'ADNmt.

#### II-6-2- Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est une maladie neurodégénérative qui atteint spécifiquement les neurones dopaminergiques de la substance noire par le développement d'agrégats cytoplasmiques appelés corps de Lewy. Cette pathologie est diagnostiquée chez des patients de près de 60 ans qui présentent une hypertonie musculaire, un tremblement au repos des extrémités et d'une akinésie (rareté et lenteur des mouvements). La plupart des cas de Parkinson sont liés au vieillissement et présentent une altération des fonctions mitochondriales notamment de la phosphorylation oxydative (Parker et al., 1989; Shoffner et al., 1991). En effet, le cerveau de certains patients (post mortem) montre une activité réduite du complexe I de la chaîne respiratoire (Schapira et al., 1990) et leur substance noire présente une accumulation de grandes délétions de l'ADNmt (Bender et al., 2006; Kravtsov et al., 2006). D'autre part, le MPTP (1-méthyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine), utilisé pour développer des modèles de la maladie de Parkinson, et la roténone, retrouvée dans les pesticides, sont des molécules pharmacologiques qui inhibent le complexe I de la chaîne respiratoire et permettent d'engendrer des formes de parkinsonisme.

Une faible proportion de la maladie provient de problèmes génétiques. Ces formes héréditaires correspondent à des mutations des gènes codant les protéines PINK1 (PTEN Putative Kinase 1), la Parkine, DJ-1, l' $\alpha$ -synucléine ou LRRK2 (Leucine Rich Kinase 2)



(Nuytemans et al., 2010; Winklhofer and Haass, 2010). Ces protéines influencent toutes le fonctionnement mitochondrial par le biais d'un stress oxydant.

Certaines formes génétiques de la maladie de Parkinson perturbent le « contrôle qualité » des mitochondries, comme en témoigne les mutations de la Parkine, une ubiquitine ligase E3 cytosolique. Pour exercer sa fonction, la Parkine a besoin de PINK1, une sérine / thréonine kinase mitochondriale retrouvée dans les membranes interne et externe des mitochondries (Jin et al., 2010; Silvestri et al., 2005; Zhou et al., 2008). PINK1 est traduite sous la forme d'une isoforme longue ciblée à la membrane interne au sein de laquelle elle est clivée en forme courte à la membrane externe par la protéine PARL (Presenilin-Associated Rhomboid-Like) (Deas et al., 2011; Jin et al., 2010; Meissner et al., 2011). Les deux formes de PINK1 interagissent avec les adaptateurs Miro et Milton ou encore avec la mitofiline protéine qui intervient dans la structuration des crêtes mitochondriales (Weihofen et al., 2009). La perte de la protéine PINK1 entraîne des dysfonctions mitochondriales avec une perte du potentiel de membrane mitochondrial, une réduction de la synthèse d'ATP et de la respiration (Gegg et al., 2009; Liu et al., 2009a; Wood-Kaczmar et al., 2008).

### II-6-3- Maladie de Huntington

La maladie de Huntington ou Chorée de Huntington est une maladie neurodégénérative autosomale dominante se caractérisant par des mouvements involontaires de danse, de la rigidité, de la perte de poids, de la démence et des troubles psychiatriques. Les symptômes proviennent d'une dégénérescence spécifique des neurones GABAergiques à longues projections dans le striatum qui contrôlent le mouvement, la mémoire et les émotions. La perte précoce neuronale et les dysfonctions apparaissent non seulement au niveau du striatum mais aussi dans le cortex des patients atteints de la maladie de Huntington (Bossy-Wetzell et al., 2008; Rosas et al., 2002). Le dysfonctionnement neuronal proviendrait de la formation d'agrégats de la protéine Huntingtine s'accompagnant de corps d'inclusion (Davies et al., 1997; DiFiglia et al., 1997; Sapp et al., 1999). La maladie de Huntington résulte d'une augmentation anormale du nombre de motifs répétés, CAG CAG, qui code une queue N-terminale poly-glutamine de la protéine Huntingtine. L'augmentation de cette extension détermine directement la pénétrance de la maladie. En effet, une modification de moins de 35 poly-glutamine n'altère pas la fonction de la protéine, entre 36 et 39 glutamines résulte en une pénétrance incomplète de la maladie, et plus de 40 glutamines conduit à une pleine pénétrance (Myers, 2004). La queue poly-glutamique s'étend au cours de la vie dans le striatum par l'action de l'enzyme OGG1 qui est induite lors d'un stress oxydant (Kovtun et al., 2007).



Les dysfonctions mitochondriales jouent un rôle important dans la pathogénicité de la maladie de Huntington (Lin and Beal, 2006). En effet, les patients présentent une diminution du métabolisme du glucose et une augmentation du lactate dans les régions du cerveau affectées par la maladie de Huntington et une réduction des activités des complexes II, III et IV de la chaîne respiratoire (Jenkins et al., 2005) (Gu et al., 1996). De même, les cellules striatales de souris porteuses d'une mutation de la Huntingtine montrent des défauts de respiration mitochondriale et de synthèse d'ATP (Milakovic and Johnson, 2005).

Les mitochondries des patients atteints de la maladie de Huntington accumulent des délétions de l'ADNmt et présentent des changements morphologiques des mitochondries au cours de la progression de la maladie (Panov et al., 2002; Squitieri et al., 2006) (Banoei et al., 2007; Horton et al., 1995).

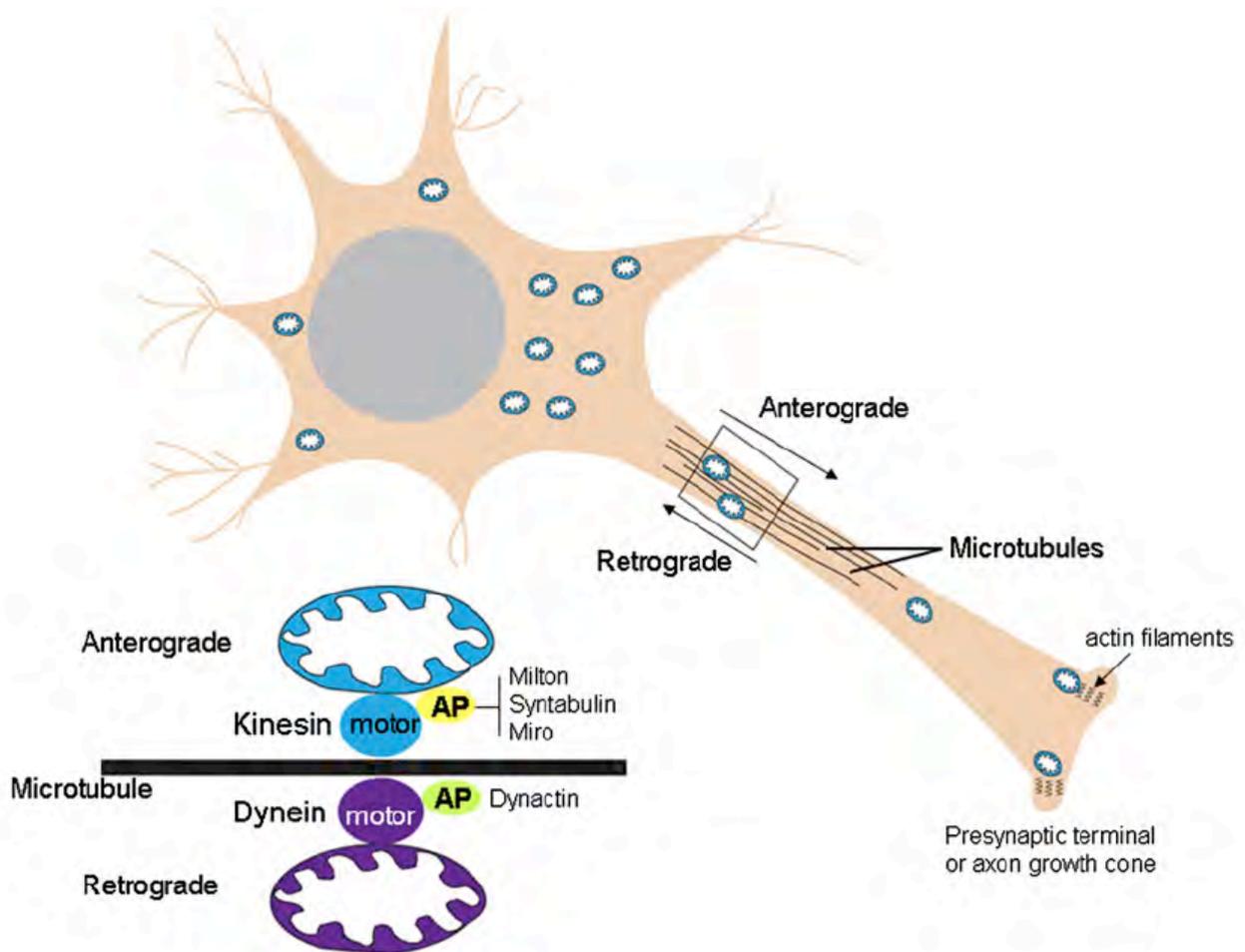
### **III- MITOCHONDRIES ET NEURONES**

#### **III-1- Production d'ATP et gestion du calcium**

Le SNC qui ne représente que 2% du poids corporel est l'organe le plus consommateur d'énergie ; il consomme près de 20% de l'oxygène corporel (Silver and Erecinska, 1998). Les neurones nécessitent de grandes quantités d'ATP pour le maintien des gradients ioniques ainsi que pour le processus de neurotransmission. En effet, le transport actif des flux ioniques de part et d'autres de la membrane plasmique grâce à l'activité de la Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATPase et de la Ca<sup>2+</sup>-ATPase, compte pour environ 60 à 80% de la consommation en ATP du SNC. 20% de l'ATP produit, sert à la neurotransmission qui inclut la synthèse, l'emballement des neurotransmetteurs dans les vésicules et le transport de ces vésicules jusqu'aux terminaisons pré-synaptiques (Ames, 2000; Erecinska et al., 1996; Kann and Kovacs, 2007).

La majeure partie de la production d'ATP dans les neurones est d'origine mitochondriale (Ames, 2000; Erecinska et al., 1996; Fiskum et al., 1999; Mayevsky and Chance, 1975; Nicholls and Budd, 2000). La physiologie neuronale dépend donc étroitement de l'intégrité des mitochondries.

Outre son rôle de production d'énergie, la mitochondrie intervient dans la régulation du calcium cytosolique lors d'une activité neuronale par le biais de son rôle de tampon calcique. En effet, l'activation neuronale qui se traduit entre autres par une augmentation transitoire du calcium cytosolique, provoque des augmentations toutes aussi transitoires de la concentration du calcium mitochondrial qui induisent des dépolarisations mitochondriales



**Illustration 20: Les transports antérograde et rétrograde des mitochondries dans les neurones (Mattson et al., 2008)**

Les microtubules servent de route le long de laquelle les mitochondries se déplacent soit vers la terminaison pré-synaptique (transport antérograde) ou vers le corps cellulaire (transport rétrograde). Les protéines motrices dépendent de l'ATP et qui se déplacent mitochondries le long des microtubules sont composées des kinésines (antérograde) et de la dynéine (rétrograde). Les mitochondries s'associent avec le moteurs par des protéines adaptatrices spécifiques (AP). Les kinésines s'associent à Milton, à la syntabuline et Miro. La Dynactine est un protéine adaptatrice de la dynéine. Au sein de l'axone, du cône de croissance et des terminaison pré-synaptiques, les mitochondries peuvent être ancrées et déplacées le long des filaments d'actine par un moteur de type myosine

et stimulent la phosphorylation oxydative (Bindokas et al., 1996; Duchen, 1992; Kann et al., 2003; Lewis and Schuette, 1975; Mironov and Richter, 2001; Peng and Greenamyre, 1998; Shuttleworth et al., 2003). De plus, lors de l'activité neuronale, le calcium permettrait une adaptation neuro-métabolique en stimulant les enzymes du cycle de Krebs (Hansford and Zorov, 1998; McCormack et al., 1990).

### **III-2- Mobilité et distribution mitochondriales dans les neurones**

Dans les neurones, les mitochondries sont mobilisées, relocalisées ou immobilisées à différents sites, comme les cônes de croissance, les éléments pré- et post-synaptiques, les nœuds de Ranvier, au cours du développement et en fonction de l'activité neuronale (Hollenbeck, 2005). Les sites à coloniser sont souvent éloignés du site de biogenèse mitochondriale qui est majoritairement le soma, même si une biogenèse mitochondriale a récemment été décrite au niveau des zones distales des axones (Amiri and Hollenbeck, 2008). Les mitochondries endommagées retournent, elles, au niveau du soma pour y être recyclées par mitophagie. La mobilité des mitochondries met en jeu la coopération des différents cytosquelettes. Le transport « longue distance » des mitochondries est pris en charge par les microtubules et leurs moteurs protéiques, alors que le cytosquelette d'actine est impliqué dans l'ancrage des mitochondries ou dans des mouvements de courte distance notamment au niveau des dendrites (Chada and Hollenbeck, 2004; Hirokawa and Takemura, 2005; Morris and Hollenbeck, 1995). Les filaments intermédiaires comme les neurofilaments ancrent les mitochondries sous la dépendance du potentiel de membrane mitochondrial (Wagner et al., 2003).

#### III-2-1- Transport antérograde (Illustration 20)

Le transport antérograde des mitochondries sur le cytosquelette de microtubules est très dynamique (1µm/s) (Misgeld et al., 2007). Ce type de transport, qui achemine des cargos du soma à la périphérie (extrémité « plus » des microtubules), fait intervenir les kinésines KIF5 et KIF1B (Hirokawa and Takemura, 2005). KIF1B est plutôt exprimée dans le cerveau ; KIF5 A et C sont des moteurs spécifiques des neurones (Cai et al., 2005; Nangaku et al., 1994).

Chez la drosophile, la GTPase Miro, une protéine ancrée à la membrane externe mitochondriale s'associe à la protéine Milton. Ceci permet l'association de la mitochondrie à Milton qui intervient comme protéine adaptatrice et régulatrice du transport mitochondrial en liant les kinésines (Glater et al., 2006; Guo et al., 2005; MacAskill and Kittler, 2009;



Saotome et al., 2008; Stowers et al., 2002). La perte de Miro provoque une réduction des mitochondries en mouvement dans des cultures primaires de neurones (Guo et al., 2005; MacAskill and Kittler, 2009; Saotome et al., 2008).

Les orthologues mammifères MIRO 1 et 2 s'associent avec les orthologues de Milton TRACK1 et 2 (MacAskill and Kittler, 2009; Smith et al., 2006). Les TRACKs transportent non seulement les mitochondries mais aussi les endosomes/lysosomes. La protéine Miro permet le transport des mitochondries le long des microtubules dans des cultures primaires de neurones hippocampiques grâce à son interaction avec le moteur des microtubules KIF5 (MacAskill and Kittler, 2009).

La syntabuline, FEZ1 et RanBP2 ont été également impliquées dans le transport antérograde des mitochondries. FEZ1, une protéine adaptatrice des kinésines, est impliquée dans le transport des mitochondries vers les neurites en croissance dans les neurones hippocampiques (Fujita et al., 2007; Ikuta et al., 2007). RanBP2 comme la syntabuline interagissent avec les moteurs des microtubules KIF5 dans le cerveau et la rétine, renforçant leur implication dans le transport mitochondrial (Cai et al., 2005; Cai et al., 2001).

### III-2-2- Transport rétrograde (Illustration 20)

Le transport rétrograde des mitochondries, de l'extrémité « plus » vers l'extrémité « moins » des microtubules, c'est-à-dire de la périphérie au soma, est un peu plus rapide comparé au transport antérograde. En effet, la vitesse est à peu près à 1,5  $\mu\text{m/s}$  (Misgeld et al., 2007). Ce transport est effectué par un complexe multiprotéique incluant la dynéine et la dynactine, complexe capable d'interagir avec la kinésine 1. Des mutations de ces protéines entraînent des défauts dans le transport rétrograde et la distribution des mitochondries au niveau des axones (LaMonte et al., 2002; Martin et al., 1999; Pilling et al., 2006; Waterman-Storer et al., 1997). Le complexe dynéine/dynactine est également important pour le transport rétrograde rapide des mitochondries (Pilling et al., 2006). Ce complexe joue un rôle dans la distribution et la morphologie des mitochondries notamment par le recrutement de DRP1 à la membrane mitochondriale par la dynéine dans les cellules HeLa (Varadi et al., 2004). Nous pourrions spéculer que lors du transport rétrograde mitochondrial dans les neurones, le complexe dynéine/Dynactine puisse recruter DRP1 pour fissionner les mitochondries avant leur transport.

### III-2-3- Immobilisation des mitochondries

Durant le développement et la différenciation neuronales, le réseau mitochondrial subit lui-même une réorganisation. Au cours de la croissance neuritique, les mitochondries



sont notamment recrutées au niveau du cône de croissance et fortement concentrées dans les lamellipodes. Le recrutement mitochondrial est réalisé par l'intermédiaire du NGF et de la voie de signalisation dépendante du récepteur NGF TrkA qui active la voie PI3 kinase (Hollenbeck, 1993; Morris and Hollenbeck, 1995). L'accumulation des mitochondries est provoquée notamment par une augmentation du nombre de mitochondries en mouvement. Les mitochondries nouvellement localisées sont ensuite retenues par le cytosquelette d'actine qui inhibe le transport antérograde (Chada and Hollenbeck, 2003, 2004; Morris and Hollenbeck, 1995). Une fois les mitochondries recrutées par le NGF au niveau des protrusions dendritiques, les mitochondries sont immobilisées à l'aide de l'effecteur actine WAVE1 et sont ancrées au cytosquelette d'actine (Chada and Hollenbeck, 2003, 2004; Sung et al., 2008). Les mitochondries recrutées au cône de croissance ont un potentiel de membrane mitochondrial plus élevé (Amiri and Hollenbeck, 2008). Les mitochondries non fonctionnelles reprennent le transport rétrograde (Miller and Sheetz, 2004).

#### III-2-4- Régulation de la mobilité des mitochondries

Au cours de l'activité neuronale, les mitochondries sont déplacées et immobilisées à des sites fortement demandeurs en énergie et qui nécessitent une régulation fine du calcium comme c'est le cas pour les synapses. Cette mobilité est entre autres régulée par le métabolisme énergétique, les concentrations calciques intracellulaires et le NO.

Le trafic mitochondrial est intimement lié au métabolisme énergétique neuronal. En effet, la mobilité mitochondriale augmente dans les dendrites où l'on voit une augmentation de la concentration en ATP alors que de fortes concentrations en ADP immobilisent les mitochondries. Ce qui suggère que la concentration en ADP (qui veut dire une forte consommation d'ATP) rend compte de l'activité locale et du besoin de recruter des mitochondries à des sites actifs, comme au niveau des synapses (Mironov, 2007).

Les niveaux de monoxyde d'azote (NO) peuvent aussi réguler le transport mitochondrial par la modulation de la production d'ATP en diminuant le potentiel de membrane mitochondrial (Rintoul et al., 2006).

La concentration calcique est également un régulateur de la mobilité et du recrutement des mitochondries. Une élévation du calcium cytosolique stoppe le mouvement mitochondrial (Rizzuto and Pozzan, 2006). L'augmentation du calcium dendritique suite à l'ouverture des récepteurs NMDA, conduit à l'immobilisation des mitochondries à proximité des épines à forte activité électrique (Li et al., 2004; MacAskill and Kittler, 2009). De même au niveau de l'axone, l'ouverture des canaux potentiel-dépendants responsables de la propagation des potentiels d'action, inhibe la mobilité des mitochondries et permet par



la suite, leur recrutement au niveau des sites pré-synaptiques (Chang and Reynolds, 2006b; Wang and Schwarz, 2009). Il a été proposé que la liaison du calcium sur la protéine Miro, inhibe son interaction avec les kinésines. Ce qui stopperait les mitochondries qui se décrocheraient des moteurs inactivés (MacAskill and Kittler, 2009). Un second modèle propose que Miro et les kinésines sont liées à de fortes concentrations en calcium, ce qui empêcherait la liaison des mitochondries aux microtubules (Wang and Schwarz, 2009).

### **III-3- Dynamique mitochondriale dans les neurones**

#### III-3-1- Distribution et dynamique mitochondriales

Outre son rôle dans le contrôle de la forme des mitochondries, la dynamique mitochondriale influence la distribution et le transport de l'organelle dans les neurones.

Les modèles animaux de la CMT2A hétérozygotes mutantes pour le gène Mfn2, présentent une agrégation des mitochondries périnucléaires au niveau des cellules de Purkinje (Chen et al., 2007). La perte de la protéine de fusion MFN2 provoque une agrégation et une immobilisation des mitochondries au niveau du corps cellulaire de neurones de ganglions dorsaux en culture (Baloh et al., 2007; Detmer and Chan, 2007). De plus, dans des souris surexprimant une forme mutée de MFN2 dans les neurones moteurs périphériques, les mitochondries s'agrègent cette fois-ci au niveau des axones (Detmer et al., 2008). Ce type d'agrégation est aussi observé au niveau des parties distales des axones observés dans des biopsies de nerfs de patients atteints de CMT2A (Vallat et al., 2008; Verhoeven et al., 2006). D'autre part, des souris dépourvues de MFN2, présentent un défaut des transports antérograde et rétrograde touchant spécifiquement les mitochondries (Misko et al., 2010). Ainsi, l'ensemble de ces travaux met en évidence le rôle des MFN1 et 2 dans le transport des mitochondries par interaction directe avec les protéines de transport Miro et Milton qui relie les mitochondries aux moteurs des microtubules.

Des mutations de la protéine de fission DRP1 chez la drosophile provoquent un défaut de distribution des mitochondries, absentes des synapses de la jonction neuromusculaire chez les mutants à l'état hétérozygote (Verstreken et al., 2005). Les mitochondries sont également absentes des synapses de neurones hippocampiques exprimant un dominant négatif de DRP1, en culture primaire (Li et al., 2004). À l'inverse, la surexpression de la forme sauvage de DRP1 accroît le nombre de mitochondries aux épines dendritiques dans ce même modèle (Li et al., 2004).



Des mutations de la protéine OPA1 peuvent également entraîner des perturbations de la distribution des mitochondries. En effet, leur distribution est anormale dans des myotubes et des fibroblastes de patients atteints de l'ADOA-1 (Spinazzi et al., 2008). On observe aussi des défauts de distribution dans des cellules ganglionnaires de la rétine de rats dont la quantité d'OPA1 est diminuée par interférence ARN (Kamei et al., 2005; Lenaers et al., 2009).

### III-3-2- Maladies neurodégénératives et dynamique mitochondriale

Ces dernières années ont démontré l'importance des mitochondries dans l'étiologie des maladies neurodégénératives. Des travaux plus récents sont venus compléter ce tableau en mettant en évidence le rôle de la dynamique mitochondriale dans ce type de pathologies.

#### **Dynamique mitochondriale et maladie d'Alzheimer**

Récemment, des études ont montré une atteinte de la dynamique mitochondriale chez des patients affectés par la maladie d'Alzheimer (Wang et al., 2008). En effet, les mitochondries sont agrégées au niveau périnucléaire dans des neurones pyramidaux (Wang et al., 2009). De plus, les quantités de protéines DRP1, MFN et OPA1 sont diminuées dans des hippocampes de ces patients, contrairement à FIS1 qui tend à augmenter. Bien que la quantité protéique totale de DRP1 diminue, sa localisation mitochondriale et son niveau de phosphorylation sur la serine 616, qui tous deux activent la fission, augmentent (Taguchi et al., 2007; Wang et al., 2009). De même, la S-nitrosylation spécifique de DRP1 sur la cystéine 644 est également accrue (Cho et al., 2009), provoquant l'augmentation de son activité GTPase. Toutefois, des études montrent également une élévation de la nitrosylation de DRP1 sans que le résidu ait été identifié et qui n'augmente pas l'activité GTPase (Bossy et al., 2010). Dans ce dernier cas, on peut imaginer que les nitrosylations mises en évidence sont aspécifiques. Par ailleurs, une étude récente montre une interaction directe du peptide  $\beta$ -amyloïde avec DRP1 chez les patients, qui pourrait entraîner les dysfonctions mitochondriales observées et conduire à la perte synaptique (Manczak et al., 2011). À l'échelle cellulaire, la surexpression du peptide  $\beta$ -amyloïde entraîne une augmentation plus importante du niveau des EAOs, dans des lignées de neuroblastomes humains surexprimant la protéine DRP1, et s'accompagne d'une diminution du potentiel de membrane mitochondrial (Wang et al., 2009). À l'inverse, la surexpression de la dynamine OPA1 diminue le taux des EAOs en présence du peptide neurotoxique dans cette même lignée cellulaire.



## Dynamique mitochondriale et maladie de Parkinson

De nombreuses études montrent une perturbation de la dynamique mitochondriale dans la maladie de Parkinson. Les protéines PINK1, Parkine, l' $\alpha$ -synucléine et DJ-1 sont mutées dans les formes génétiques de Parkinson et ont un impact sur la dynamique mitochondriale.

Des mutations de PINK1 et de la Parkine provoquent une perturbation de la mitophagie (Youle and Narendra, 2011), ce qui a mis en évidence l'importance de ces deux protéines sur le contrôle qualité des mitochondries. PINK1, située à la membrane externe mitochondriale, recrute la Parkine lorsque le potentiel de membrane mitochondrial diminue, ce qui conduit à la fragmentation des mitochondries de manière « DRP1-dépendante » (Deng et al., 2008; Jin et al., 2010; Narendra et al., 2010; Vives-Bauza et al., 2011). La Parkine amplifie la fission mitochondriale par l'ubiquitinylation des mitofusines qui sont alors dégradées par le protéasome (Gegg and Schapira, 2011; Rakovic et al., 2011). L'ubiquitinylation du canal VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) par la Parkine permet le recrutement de LC3 (proteïn-1 Light chain-3) pour construire un autophagosome autour de la mitochondrie endommagée en coopération avec les adaptateurs HDAC6 et causant la mitophagie des mitochondries endommagées (Vives-Bauza et al., 2011). Cependant, des controverses subsistent quant à l'action du duo PINK1/Parkine sur la morphologie des mitochondries (Wang et al., 2011). Dans certains cas, la perte de PINK1 entraîne la fragmentation mitochondriale alors que dans d'autres, c'est l'élongation qui est majoritaire (Liu et al., 2011; Wang et al., 2011; Yang et al., 2008; Yu et al., 2011).

La protéine DJ-1, une protéine multifonctionnelle, protège les cellules d'un stress oxydant et est capable d'interagir directement avec le complexe I de la chaîne respiratoire (Canet-Aviles et al., 2004; Hayashi et al., 2009). De plus, elle interagit avec PINK1 et la Parkine et permet de moduler la dynamique mitochondriale de manière EAOs dépendante (Hayashi et al., 2009; Irrcher et al., 2010).

L' $\alpha$ -synucléine qui est le composant majeur des corps de Lewy retrouvés dans la membrane plasmique, provoque la fragmentation des mitochondries lorsqu'elle est surexprimée (Kamp et al., 2010; Nakamura et al., 2011). À l'inverse, une diminution de la quantité de cette protéine chez *C.elegans* conduit à l'élongation des mitochondries (Kamp et al., 2010). Les mutations de l' $\alpha$ -synucléine amplifient le renouvellement des mitochondries car la fragmentation, qui mène à de petites mitochondries, facilite la mitophagie (Choubey et al., 2011; Twig et al., 2008).



Ainsi, une perturbation du contrôle qualité mené par les protéines PINK1 et la Parkin qui modulent la dynamique mitochondriale, peut induire des altérations du processus d'autophagie et, par voie de conséquence, entraîner la maladie de Parkinson.

### **Dynamique mitochondriale et maladie de Huntington**

La dynamique mitochondriale est également altérée chez des patients atteints par la maladie de Huntington. En effet, les cerveaux de ces patients présentent des niveaux protéiques augmentés pour DRP1 et FIS1 et au contraire diminués pour les Mitofusines (Bossy-Wetzel et al., 2008; Kim et al., 2010; Shirendeb et al., 2011). L'expression de la protéine Huntingtine mutante dans des neurones corticaux de rat en culture primaire, provoque la fragmentation des mitochondries par une interaction directe avec DRP1 accompagnée d'un accroissement de l'autophagie qui aboutit finalement à la mort neuronale (Song et al., 2011).

#### III-2-5- Dynamique mitochondriale et transmission synaptique

Alors que le rôle des mitochondries dans la transmission synaptique est connu depuis de nombreuses années (voir chapitre III-1), l'impact de la dynamique mitochondriale sur ce processus commence à peine à émerger. De plus, les recherches dans ce domaine se sont essentiellement restreintes à l'étude de l'influence de la protéine DRP1 sur la transmission synaptique dans des neurones en culture primaire.

L'équipe de Morgan Sheng a étudié l'influence la dynamique mitochondriale sur la morphologie des épines dendritiques. Pour cela, la protéine DRP1 sauvage et le mutant dominant négatif catalytiquement inactif (DRP1 K38A) ont été surexprimés dans des neurones hippocampiques en culture primaire (Li et al., 2004).

La surexpression de DRP1, sous forme sauvage ou mutée, n'altère pas l'arborescence dendritique des neurones. Cependant, alors que la surexpression du dominant négatif de DRP1 provoque une réduction du nombre d'épines dendritiques et une diminution du nombre de mitochondries au niveau dendritique, la surexpression de la forme sauvage de la dynamine provoque une augmentation des épines dendritiques et du nombre d'organelles à proximité des synapses. Ainsi, la protéine de fission DRP1 permettrait une relocalisation des mitochondries vers les futures synapses, nécessaire pour une production locale d'ATP. En accord avec cette hypothèse, la stimulation énergétique par la créatine des mitochondries déjà présentes, conduit également à une augmentation du nombre de synapses.



Les mitochondries s'accumuleraient donc à proximité des synapses en cours de développement grâce à un processus de fission « DRP1-dépendant ». Le facteur anti-apoptotique Bcl-xl, dont la surexpression augmente le nombre de synapses dans des neurones hippocampiques en culture primaire, agirait de la même façon en se complexant à DRP1 et en stimulant son activité GTPase (Hickman et al., 2008; Li et al., 2008).

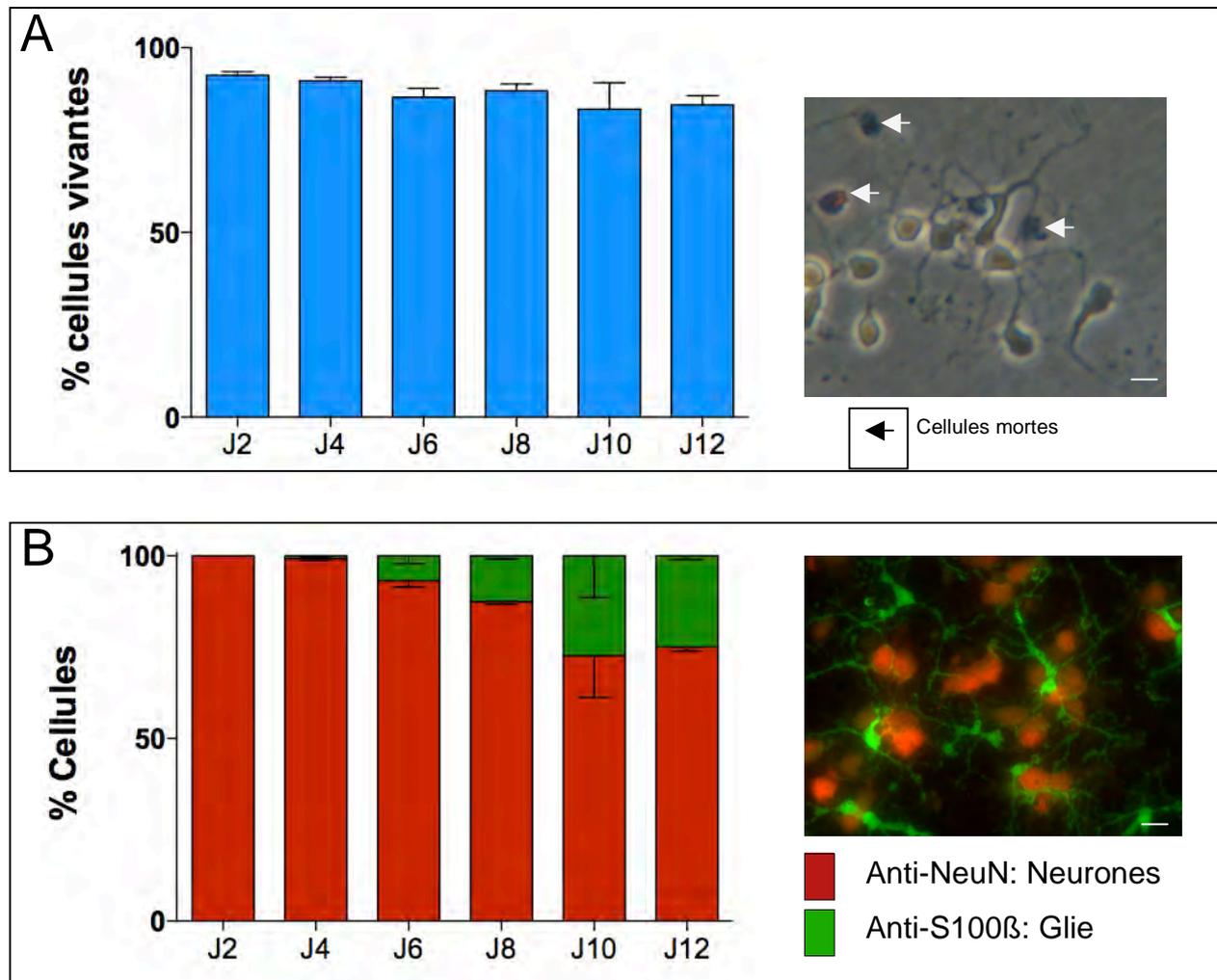
Enfin la mutation de DRP1 chez la drosophile provoque une agrégation des mitochondries au niveau du soma dans des neurones périphériques et une diminution du nombre de mitochondries à la synapse (Verstreken et al., 2005). Le peu de mitochondries résidant à proximité des boutons synaptiques de la plaque motrice, sont courtes. Ces mitochondries présentent une altération de leur rôle de tampon du calcium. En dépit d'une réduction du nombre de mitochondries au niveau des synapses et d'une concentration calcique intracellulaire augmentée, on ne note aucune altération des propriétés basales de libération des neurotransmetteurs à des concentrations physiologiques de calcium. En revanche, lors de stimulations synaptiques répétées, le pool des vésicules de réserve contenant des neurotransmetteurs n'est pas mobilisé, par manque en ATP.



## PROBLÉMATIQUE

Afin de mieux comprendre les mécanismes physiopathologiques à l'origine de l'ADOA-1, notre équipe a étudié les effets de l'expression de mutants pathogènes de la protéine sur la morphologie des mitochondries et la sensibilité à l'apoptose de fibroblastes de peau de patients atteints de cette maladie (Olichon et al., 2007). Quels que soient la mutation et les mécanismes engendrés, haplo-insuffisance ou « dominance négativité », l'expression de ces mutants sensibilise les cellules à l'apoptose. Ainsi, les neurones ganglionnaires de la rétine de patients atteints d'ADOA-1 pourraient dégénérer par apoptose comme cela a été proposé pour la neuropathie optique de Leber (Carelli et al., 2004). La mort cellulaire induite par l'inactivation d'OPA1 pourrait être la conséquence du rôle primaire de cette protéine dans la dynamique de la membrane interne ou dans l'apoptose. Cependant, les données récentes sur l'influence de la dynamique mitochondriale sur l'énergétique, la production d'EOs, l'homéostasie calcique et le transport de l'organelle nous ont conduits à envisager d'autres pistes d'études. En effet, dans les pathologies neurodégénératives liées à l'âge, pour lesquelles l'implication des mitochondries est largement documentée, des dysfonctions au niveau ces différents processus ont été mises en évidence (Chang and Reynolds, 2006a; Hollenbeck and Saxton, 2005; Kwong et al., 2006; Lin and Beal, 2006). Nous avons donc exploré certaines de ces pistes en élargissant notre problématique à l'étude de l'influence de la dynamique mitochondriale sur les neurones dans des contextes physiologiques et physiopathologiques.

Mon projet de thèse s'est donc inscrit dans un objectif global visant à déterminer si la dynamique mitochondriale pouvait intervenir dans la maturation et le fonctionnement neuronal et contribuer par ses dérégulations, à l'étiologie des pathologies neurodégénératives. Pour répondre à ces interrogations nous avons choisi de travailler sur un modèle de neurones corticaux en culture primaire capables de progresser d'un état immature à un état mature *ex vivo* (Chang and Reynolds, 2006a). Compte tenu de notre expertise et de l'articulation de ce projet avec les autres projets de l'équipe, notre intérêt s'est particulièrement porté sur la protéine « fusogène » OPA1 et les conséquences de sa perte de fonction.



**Figure 1: Caractérisation des cellules embryonnaires corticales de rat en culture primaire**

**A:** La viabilité des cellules corticales a été estimée en présence de Bleu Trypan, qui pénètre dans les cellules mortes. Les cellules vivantes et mortes ont été décomptées au microscope optique (n=300) tous les deux jours en culture.

**B:** Aux mêmes stades, le pourcentage de neurones et de cellules gliales présentes dans la culture corticale est estimé par comptage (n=300) au microscope à fluorescence des cellules marquées par des anticorps dirigés respectivement contre la protéine nucléaire NeuN (rouge) ou contre la protéine cytoplasmique S100β (vert). Barre d'échelle 10μM.

## RÉSULTATS

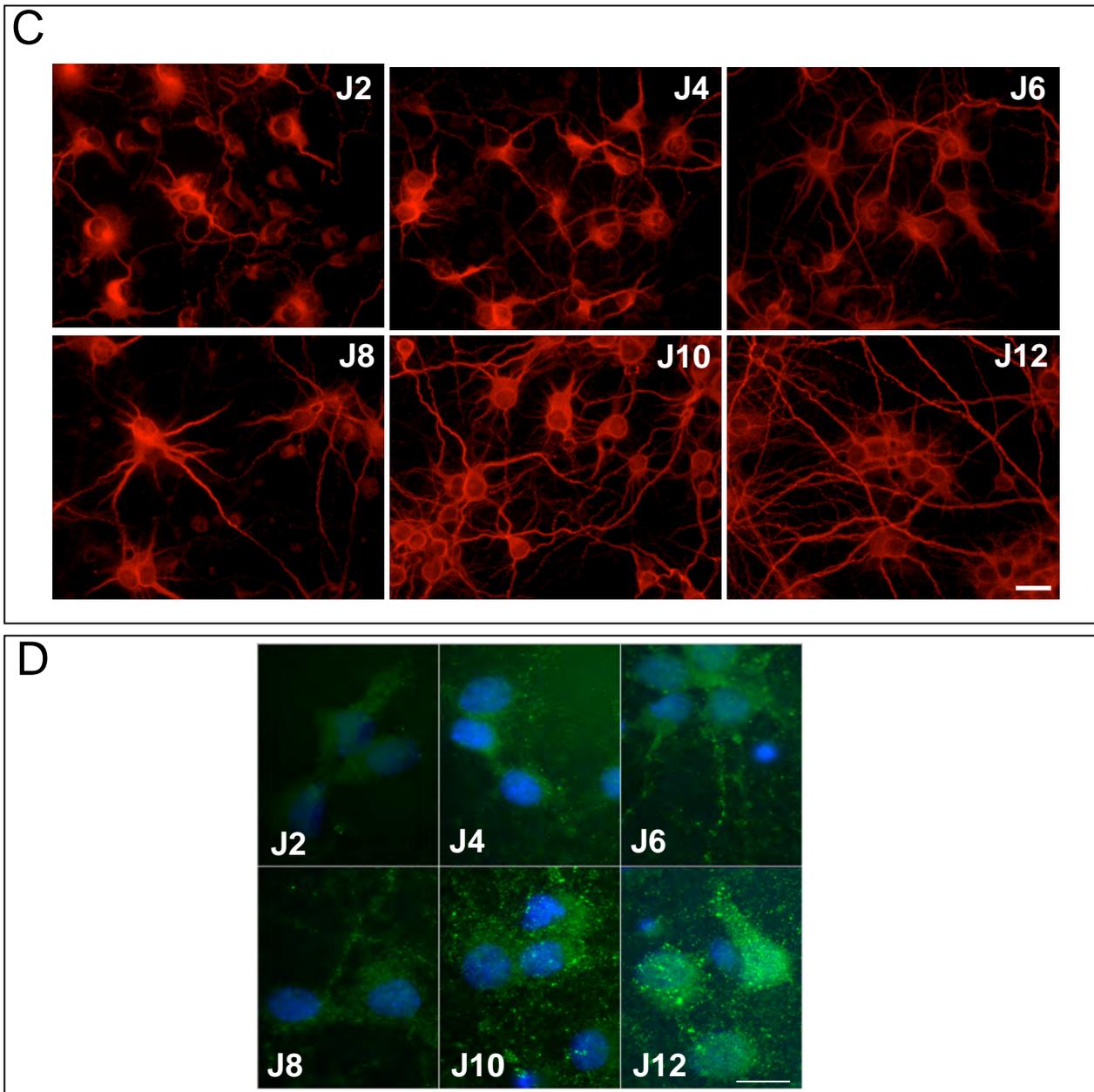
### I- Mise en place d'un modèle cellulaire neuronal pour l'étude d'OPA1

En dépit de la présence d'OPA1 dans tous les types cellulaires, la perte de fonction de cette dynamine engendre principalement des atteintes neurologiques. Afin de comprendre l'influence spécifique d'OPA1 sur les neurones, mon équipe a choisi de mettre en place au laboratoire un modèle de culture neuronale.

Notre choix s'est porté sur une culture primaire de neurones corticaux embryonnaires, largement décrit et utilisé dans la littérature (Brewer et al., 1993) (Chang and Reynolds, 2006a; Hall et al., 2007). Lors de la mise en culture, les neurones corticaux prélevés au stade embryonnaire E17, sont capables de maturation *ex vivo*, comme en témoignent la croissance neuritique et la mise en place de la synaptogenèse (Chang and Reynolds, 2006a). De plus, après une quinzaine de jours, ces neurones développent un fonctionnement électrique proche de celui que montrent les neurones *in vivo* (Hall et al., 2007). Ce modèle a été préféré à un modèle de culture primaire de cellules ganglionnaires de la rétine compte tenu de sa facilité de mise en oeuvre mais surtout de la possibilité de réaliser sur ce modèle des approches biochimiques nécessitant de grandes quantités de matériel. La découverte de formes syndromiques de l'ADOA-1, dont les atteintes ne sont pas restreintes aux cellules ganglionnaires de la rétine, a conforté notre choix. De plus, ce modèle présentant des caractéristiques communes à tous les neurones pouvait être utilisé pour étudier l'impact de l'inactivation d'autres acteurs de la dynamique mitochondriale, comme MFN2 et DRP1, qui présentent également un tropisme fort pour les neurones.

Notre modèle de culture primaire de neurones a été établi à partir de cortex prélevés sur des embryons de rats au stade E17 (Chang and Reynolds, 2006a). Après prélèvement des embryons sur femelles anesthésiées, les cortex ont été disséqués puis dissociés mécaniquement. Les cellules ont été mises en culture (Jour 0, J0) à des densités allant de 45 000 à 70 000 cellules/cm<sup>2</sup> dans le milieu Neurobasal pendant douze jours (Jour 12, J12). L'ensemencement de 60 000 cellules/cm<sup>2</sup> ayant donné les meilleurs résultats en termes de maturation des neurones et de visualisation des mitochondries, cette condition a été utilisée pour toutes les expériences.

Nous avons dans un premier temps validé notre modèle cellulaire, en terme de viabilité et de composition. L'évolution de la viabilité des cultures corticales primaires au cours du temps a été suivie par coloration au Bleu Trypan des cellules mortes, perméables à



**Figure 1: Caractérisation des cellules embryonnaires corticales de rat en culture primaire**

**C:** Le processus de maturation dendritique a été suivi par immunodétection de la protéine associée aux microtubules, Map2, tous les deux jours en culture. Barre d'échelle 20 $\mu$ M.

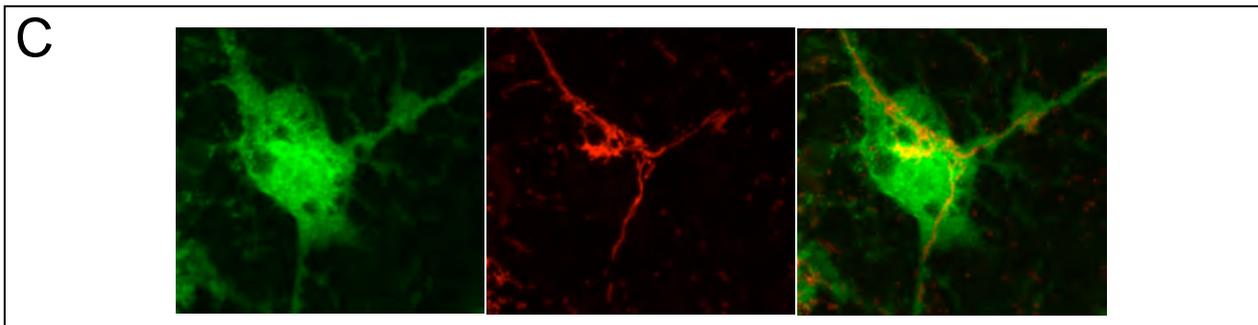
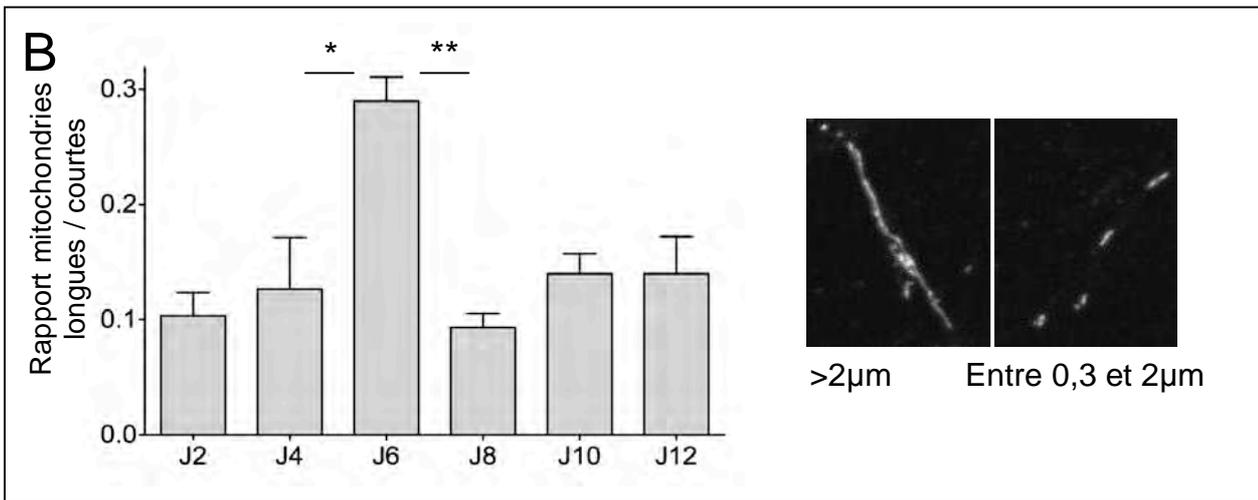
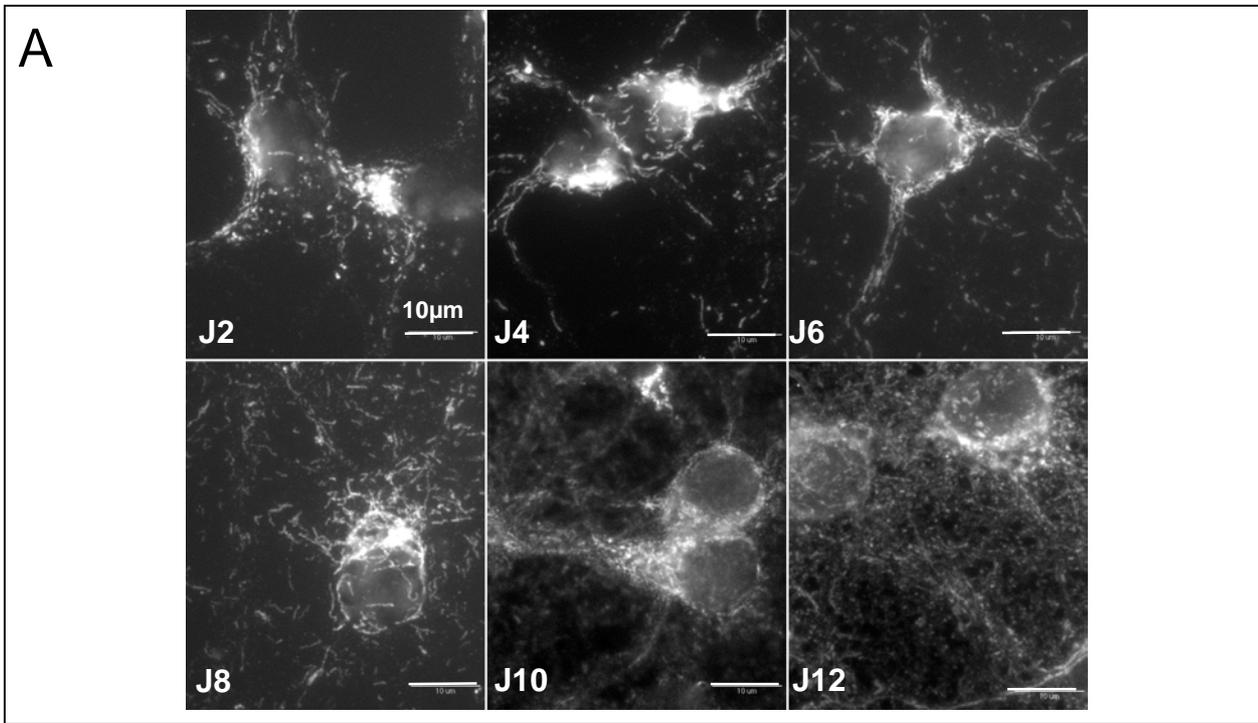
**D:** le processus de synaptogenèse a été suivi par immunodétection de la synaptophysine (vert), un constituant des vésicules pré-synaptiques, tous les deux jours en culture. Le noyau est visualisé par coloration au Hoechst (bleu). Barre d'échelle 10 $\mu$ M.

ce colorant. La proportion de cellules vivantes reste élevée jusqu'au douzième jour de culture pour lequel elle est de 85% (Fig.1A).

Au stade auquel sont prélevés les cortex embryonnaires de rat, le tissu nerveux est pour plus de 95% constitué de neurones. En culture, ces neurones sont post-mitotiques contrairement à la faible proportion de cellules gliales présentes qui sont prolifératives. Ainsi, au cours du temps, les cellules gliales se divisent et peuvent devenir majoritaires. Pour évaluer la part respective de chacune de ces populations, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence indirecte avec des anticorps dirigés soit contre la protéine NeuN, spécifique des neurones, soit contre S100 $\beta$ , protéine présente dans les astrocytes et la microglie. Les proportions de neurones et de cellules gliales ont été estimées par comptage sous microscope à fluorescence (Fig.1B). Les cellules gliales ne sont détectées qu'à partir du sixième jour de culture, pour lequel elles représentent environ 7% de la population totale. Au cours des douze jours de culture, cette proportion augmente, mais ne dépasse pas 25%.

Afin de suivre la mise en place et la maturation d'un réseau neuronal en culture, nous avons ensuite analysé la croissance neuritique et la mise en place de la synaptogenèse aux jours J2, 4, 6, 8, 10 et 12 (Fig.1C et D respectivement). Les immunofluorescences indirectes ont été réalisées à l'aide d'anticorps dirigés contre  $\beta$ 3tubuline (marqueur neuronal) ou MAP2 (marqueur dendritique) pour suivre la croissance neuritique. À J2, le marquage neuronal  $\beta$ 3tubuline révèle des neurones individualisés sans connexions apparentes. Par contre, chacun des neurones étend des cônes de croissance vers leurs congénères. Les neurones donnent également naissance à des prolongements dendritiques visualisés par l'immunofluorescence MAP2. Dès J4, les neurones sont connectés et à partir de J6, le réseau neuronal se déploie considérablement et continue de s'étoffer jusqu'à J12. L'immunofluorescence indirecte de cellules corticales fixées aux différents jours de cinétique, à l'aide d'un anticorps dirigé contre la synaptophysine, un constituant des vésicules pré-synaptiques, révèle un marquage sous forme ponctiforme caractéristique. La synaptophysine est détectée à partir du 4<sup>e</sup> jour de culture et son intensité augmente au cours du temps (Fig1D). Ces résultats ont été confirmés par Western blot (Fig.3). La synaptophysine qui n'est pas détectée au jour de la mise en culture, est faiblement accumulée au 4<sup>ème</sup> jour de culture, puis sa quantité augmente progressivement jusqu'à J12.

*Nous avons donc introduit au laboratoire un modèle de culture primaire de cellules corticales qui est, jusqu'au 12<sup>e</sup> jour de culture, essentiellement composé de neurones et dont la viabilité est excellente. Au cours de la culture, les neurones sont capables de progresser d'un état immature à un état mature.*



**Figure 2: Morphologie mitochondriale dans les cellules corticales embryonnaires en culture primaire.**

**A:** La morphologie des mitochondries des neurones corticaux a été suivie au cours du temps en microscopie fluorescence après immuno-détection de sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire (anticorps OXPHOS). Barre d'échelle: 10µM.

**B :** L'analyse morphométrique réalisée à l'aide du logiciel ImageJ montre la moyenne +/- SEM du rapport du nombre de mitochondries longues sur petites, à chaque stade (200 neurones par stade, n=3, test de significativité statistique ANOVA: \*p<0.05, \*\*p<0.01).

## **II- Caractérisation du modèle**

Après avoir validé notre modèle cellulaire neuronal, nous avons souhaité caractériser son mitochondriome.

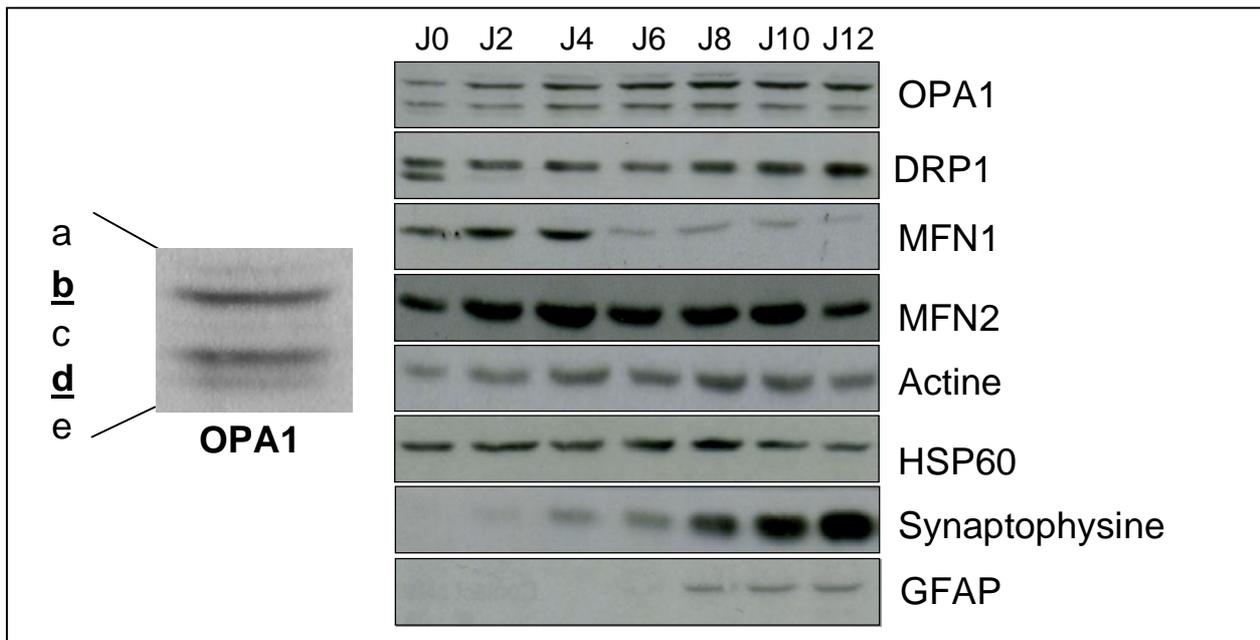
### **I-2- Caractérisation de la morphologie des mitochondries au cours de la maturation neuronale**

#### I-2-1- Morphologie des mitochondries

Pour analyser la morphologie des mitochondries des neurones corticaux, nous avons réalisé des expériences d'immunofluorescence indirecte à l'aide d'un mélange anticorps dirigés contre une sous-unité de chacun des cinq complexes de la chaîne respiratoire (anticorps OXPHOS). Les neurones ont été repérés par immuno-marquage avec un anticorps dirigé contre la protéine neuronale MAP2. L'évolution de la morphologie mitochondriale a été suivie au cours de la mise en culture en fixant les cellules corticales à J2, J4, J6 J8, J10 et J12 (Fig.2A). Une analyse morphométrique a été réalisée, après prise d'images en microscopie confocale, avec le logiciel ImageJ au niveau des régions proximales des neurites c'est-à-dire proches du soma (Fig.2B). En effet, les neurones corticaux étant de nature et de morphologie très diverses, nous avons choisi de caractériser les mitochondries dans une région où la morphologie neuronale paraît globalement commune à tous les neurones. De plus, les mitochondries formant au niveau du soma un réseau très dense, il est impossible de réaliser la mesure de ces organelles dans ce compartiment.

Les neurones présentent, au niveau du soma et des neurites et quel que soit le temps passé en culture, un mitochondriome formé de filaments (Fig.2A). Leur taille moyenne est estimée à 1,1  $\mu\text{m}$ . À J6, la figure 2B montre une augmentation d'un facteur 3 du degré de « filamentation » des mitochondries dans les neurones, représentée par le rapport entre le nombre de mitochondries dites longues (2 à 10  $\mu\text{m}$ ) et le nombre de mitochondries dites courtes (0,3 à 2  $\mu\text{m}$ ). Au delà, les mitochondries, tout en restant filamenteuses voient leur taille revenir à des valeurs similaires à celles observées à J2.

Les cellules gliales, repérées par immuno-marquage avec l'anticorps dirigé contre la protéine S100 $\beta$ , qui commencent à être détectées à partir de J6, présentent un réseau



**Figure 3: Expression des acteurs de la dynamique mitochondriale dans les cellules corticales**

L'expression des acteurs de la dynamique mitochondriale (OPA1, DRP1, MFN1 et MFN2) au cours de la maturation des cellules corticales a été suivie par Western blot, illustré ici par un blot représentatif de 6 expériences. Des protéines cytosoliques (actine) ou mitochondriales (HSP60) ont été utilisées comme témoins de charge. La GFAP permet de détecter les astrocytes et la synaptophysine le début de la maturation synaptique.

L'agrandissement de gauche illustre la répartition des différentes isoformes d'OPA1, de 'a' à 'e', et montre que les formes b et d sont majoritaires.

mitochondrial excessivement filamenteux jusqu'au douzième jour de mise en culture (Fig.2C).

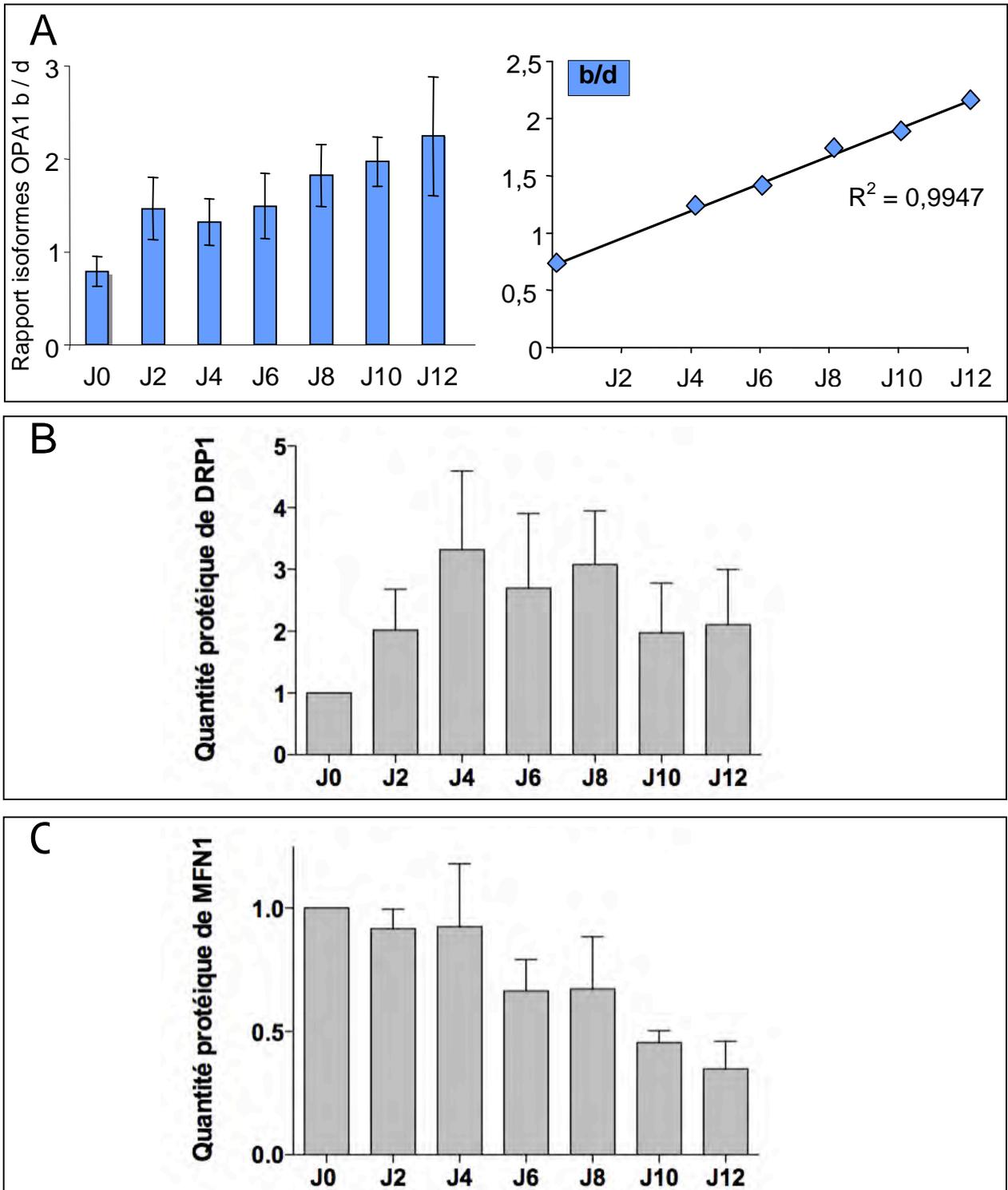
*Nous avons donc mis en évidence l'existence d'une hyperfilamentation transitoire des mitochondries au cours de la maturation des neurones en culture.*

### I-2-2- Expression des acteurs de la dynamique mitochondriale

Afin de déterminer si les changements de morphologie des mitochondries observées au cours de la maturation des neurones *ex vivo* sont corrélés à des modifications d'expression des acteurs contrôlant la dynamique mitochondriale, nous avons suivi leur expression par Western blot grâce à des anticorps dirigés contre OPA1, MFN1 et 2 et DRP1.

Comme dans les cellules HeLa, 5 isoformes (a-e) de la protéine OPA1 présentes dans des proportions variables sont détectées dans les neurones corticaux dissociés (J0); les formes b et d étant les plus abondantes (Fig.3). Le profil d'expression de la protéine OPA1 varie au cours du temps : les bandes b et d, exprimées de manière équivalente à J0, voient leur rapport se modifier au profit de la forme b de J2 à J12 (Fig.4A). Le profil de DRP1 évolue également au cours du temps : à J0, la protéine est présente sous deux isoformes, alors qu'à partir de J2 l'isoforme de plus faible poids moléculaire disparaît et la quantité d'isoforme de plus haut poids moléculaire augmente (Fig.3 et Fig.4B). Enfin, contrairement à MFN2, dont le profil d'expression reste identique au cours du temps, la quantité de MFN1, constante jusqu'à J4, diminue à partir de J6 (Fig.3 et Fig.4C).

Bien que les cellules gliales soient peu nombreuses jusqu'à J12 (Fig.1B) et que les changements d'expression de OPA1, DRP1 et MFN1 soient observés avant que le marquage GFAP spécifique des astrocytes ne soit détecté en Western blot (Fig.3), la culture primaire de neurones corticaux embryonnaires reste une culture mixte. De ce fait, pour s'assurer de la part respective des neurones et des cellules gliales dans les modifications des profils d'expression observés, nous avons réalisé des Western blots à partir d'extraits protéiques de cellules corticales traitées le lendemain de l'ensemencement par l'arabinoside C (AraC) et collectées à J8. L'AraC est une drogue toxique pour les cellules en prolifération, c'est-à-dire ici les cellules gliales (Fig.5A). Dans la population cellulaire traitée par l'AraC, dans laquelle aucun marquage GFAP n'est détecté par Western blot après 8 jours de culture, nous retrouvons des profils d'expression d'OPA1, de DRP1 semblables à ceux de cellules non traitées. Ceci révèle la contribution majeure des neurones aux changements d'expression des acteurs de la dynamique observés en culture mixte. MFN1, contrairement à



**Figure 4: Expression des acteurs de la dynamique mitochondriale dans les cellules corticales**

**A:** Evolution du rapport de densité entre les isoformes b et d d'OPA1 au cours de la maturation *ex vivo*, histogrammes des moyennes +/- SEM à gauche, droite de régression linéaire à droite.

**B:** Histogrammes de l'évolution de l'expression de la forme longue de DRP1 au cours de la maturation des cellules corticales *ex vivo*, représentant les moyennes +/- SEM (n = 3) des valeurs de chaque stade normalisées à celles de la forme longue à J0.

**C:** Histogrammes de l'évolution de l'expression de MFN1 au cours de la maturation des

MFN2, n'est pas détectée dans les cellules traitées par l'AraC. Pour compléter nos résultats, nous avons également réalisé des cultures primaires d'astrocytes corticaux à partir d'embryon de rat E20 (Bayol-Denizot et al., 2000). Après 10 jours de culture, les astrocytes expriment l'ensemble des isoformes d'OPA1, les deux mitofusines mais seulement l'isoforme de DRP1 de faible poids moléculaire. L'absence de la MFN1 dans la culture corticale traitée à l'AraC et la présence de la MFN1 dans les astrocytes, suggère que la faible quantité de la MFN1 après J6 dans les cellules corticales serait due à la présence des cellules gliales (Fig.5A).

Afin de déterminer si les observations que nous avons réalisées *ex vivo* reflètent des phénomènes se produisant *in vivo*, nous avons étudié le profil protéique des acteurs de la dynamique mitochondriale dans le cortex de rat à différents stades de développement (Fig.5B). Au stade embryonnaire E17, nous retrouvons un profil d'expression des différents acteurs, similaire à celui du jour J0 indiquant que le processus de dissociation cellulaire n'a pas eu d'influence. Au stade embryonnaire E20, au stade post-natal P1 et au stade adulte (A), le rapport isoforme b / isoforme d d'OPA1 s'établit au profit de l'isoforme b et seule l'isoforme de haut poids moléculaire de DRP1 est détectée. MFN1 toujours présente au stade embryonnaire E20, diminue à partir du stade P1 jusqu'au stade adulte.

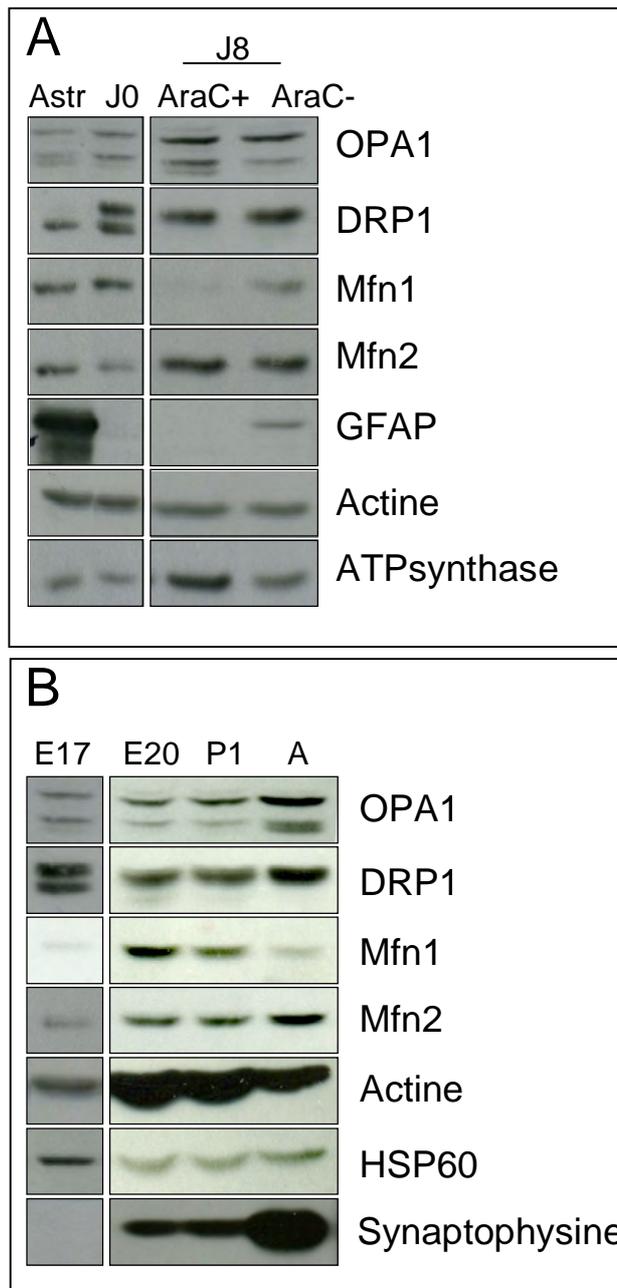
*Nous avons donc mis en évidence l'existence de modifications du profil d'expression de différents acteurs de la dynamique mitochondriale au cours de la maturation des neurones ex vivo rappelant les changements observés au cours du développement.*

### **I-3- Caractérisation de l'activité mitochondriale au cours de la maturation des neurones.**

#### I-3-1- Évolution du potentiel de membrane mitochondrial

Des données récentes montrent que l'élongation des mitochondries permet une augmentation de leur potentiel énergétique (Gomes et al., 2011). Ainsi, l'augmentation de filamentation des mitochondries dans les neurones corticaux mise en évidence à J6, pourrait s'accompagner d'une activité plus importante de la chaîne respiratoire.

Pour étudier cette hypothèse nous avons utilisé comme indicateur d'activité respiratoire le potentiel de membrane mitochondrial, qui a été mesuré en utilisant la sonde ratiométrique fluorescente JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethyl benzimidazolyl carbocyanine iodide). Ce cationique lipophile, qui s'accumule dans les mitochondries en



**Figure 5: Expression des acteurs de la dynamique mitochondriale dans les cellules corticales et chez l'animal**

**A:** L'expression de OPA1, DRP1, MFN1, MFN2, de l'actine et de l'ATP synthase a été suivie en Western blot (illustré par un blot représentatif de 3 expériences) sur protéines extraites d'astrocytes (Astro), de cellules corticales dissociées (J0) ou de cellules corticales traitées (+AraC) ou non (-AraC) par l'arabinoside qui élimine les cellules gliales.

**B:** L'expression de OPA1, DRP1, MFN1, MFN2, de la synaptophysine, de l'actine et de HSP60 a été suivie en Western blot (illustré par un blot représentatif de 3 expériences) sur des protéines extraites de cortex prélevés sur des embryons de rat aux stades 17

fonction du potentiel de membrane, est monomérique et fluoresce dans le vert quand il est présent à une faible concentration et s'agrège et fluoresce dans le rouge à de fortes concentrations (Smiley 1991). Les mitochondries ayant un potentiel membranaire élevé, concentrent donc le JC-1 sous forme d'agrégats rouges.

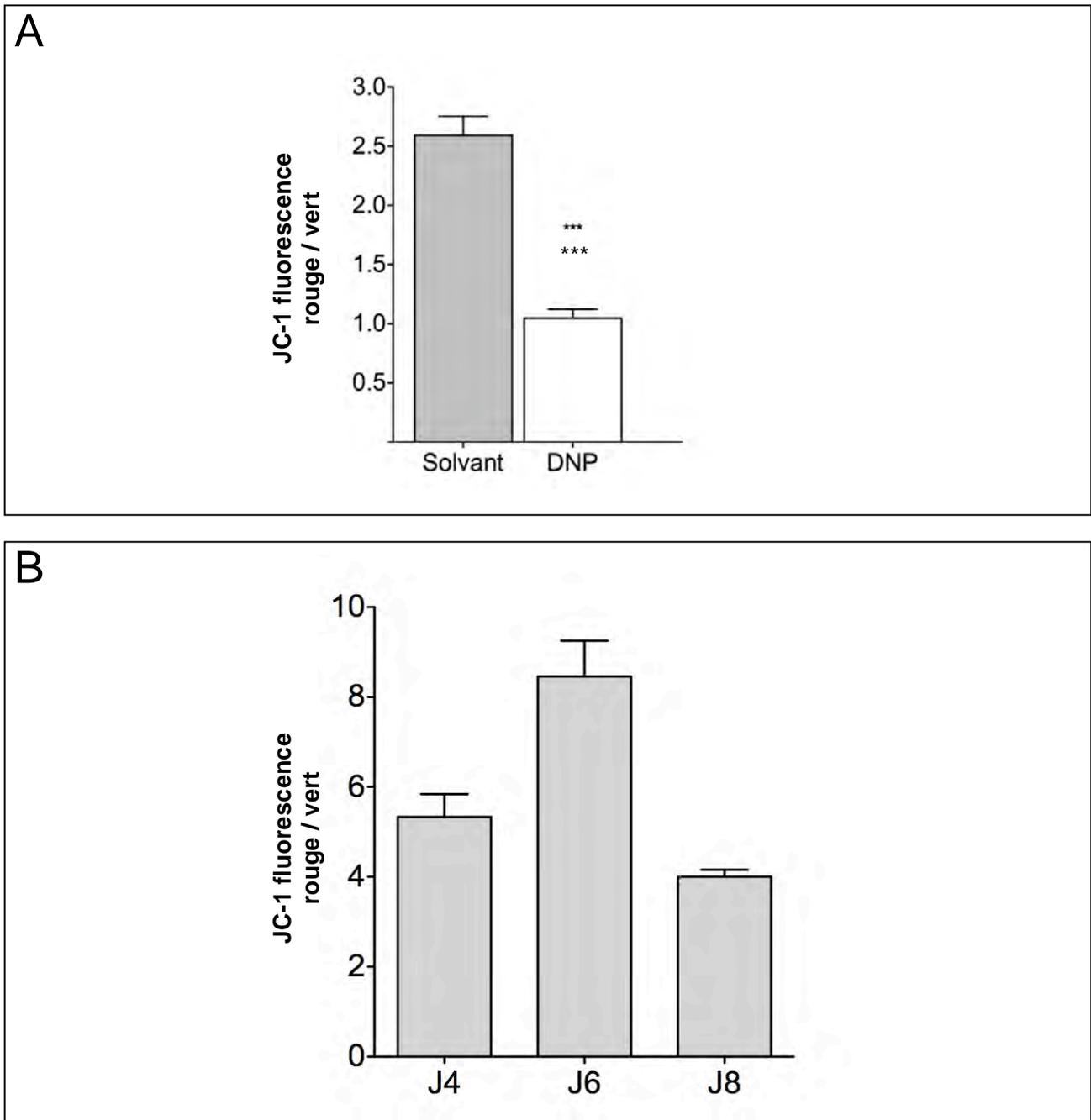
Les quantités de fluorescence rouge (535/590 nm) et verte (485/530 nm) de cellules corticales cultivées pendant 4, 6 et 8 jours puis incubées pendant 20 minutes en présence de JC-1 ont été mesurées par fluorométrie. Une pré-incubation des cellules à J6 pendant 1 heure avec du DinitroPhenol (DNP), un agent découplant de la chaîne respiratoire agissant comme un transporteur de protons, provoque une diminution du rapport de la fluorescence rouge (potentiel de membrane) sur la fluorescence verte (masse mitochondriale), validant ainsi notre test (Fig.6A). Des études préliminaires (n=2) montrent une augmentation à J6 d'un facteur de 1,5 par rapport à J4 du rapport fluorescence rouge sur fluorescence verte, et donc du potentiel de membrane mitochondrial (Fig.6B). Le potentiel de membrane mitochondrial revient à J8 à une valeur comparable à celle de J4.

*Nos expériences suggèrent une augmentation transitoire du potentiel de membrane mitochondrial à J6. L'activité de la chaîne respiratoire mitochondriale pourrait donc transitoirement augmenter au cours de la maturation neuronale ex vivo.*

### I-3-2- Evolution des EAOs

Même dans des conditions physiologiques, une part de l'oxygène (2 à 6%) n'est pas totalement réduite par la chaîne respiratoire (Turrens, 2003). Cet oxygène non réduit subit une réduction monoélectronique au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire. Ce qui aboutit à une fuite d'électrons lors du transit dans la chaîne respiratoire à l'origine de la production d'espèces actives de l'oxygène (EAOs). Ainsi, dans des conditions physiologiques, plus la chaîne respiratoire est active, plus la production des EAOs est importante. L'évaluation de la quantité des EAOs pourrait donc conforter nos observations préalables indiquant une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial, *ie* de l'activité de la chaîne respiratoire, au 6<sup>e</sup> jour de la mise en culture des neurones corticaux. Pour détecter les EAOs, nous avons utilisé la sonde H2-DCFDA (2',7' –dichlorofluorescéine diacétate). Cette sonde perméante, une fois clivée dans le cytosol par des estérases, va réagir avec les EAOs pour donner une forme fluorescente de la molécule qui émet à 527 nm (vert) après excitation à 493 nm. La sonde H2-DCFDA est sensible aux peroxydes d'hydrogène et à ses dérivés radicalaires.

Après 2 à 12 jours de mise en culture, les cellules corticales ont été incubées 30 minutes avec la sonde H2-DCFDA et la fluorescence émise a été quantifiée par



**Figure 6: Evolution du potentiel de membrane mitochondrial autour du pic de filamentation.**

**A:** Histogramme de la moyenne +/- SEM du rapport de l'émission de fluorescence rouge/vert de la sonde JC-1 reflétant le potentiel de membrane mitochondrial après traitement au DNP (2,4 dinitrophénol), un agent découplant de la chaîne respiratoire.

**B:** Histogramme de la moyenne +/- SEM du rapport de l'émission de fluorescence rouge/vert de la sonde JC-1 reflétant le potentiel de membrane mitochondrial, pour 10 boîtes de deux expériences indépendantes.

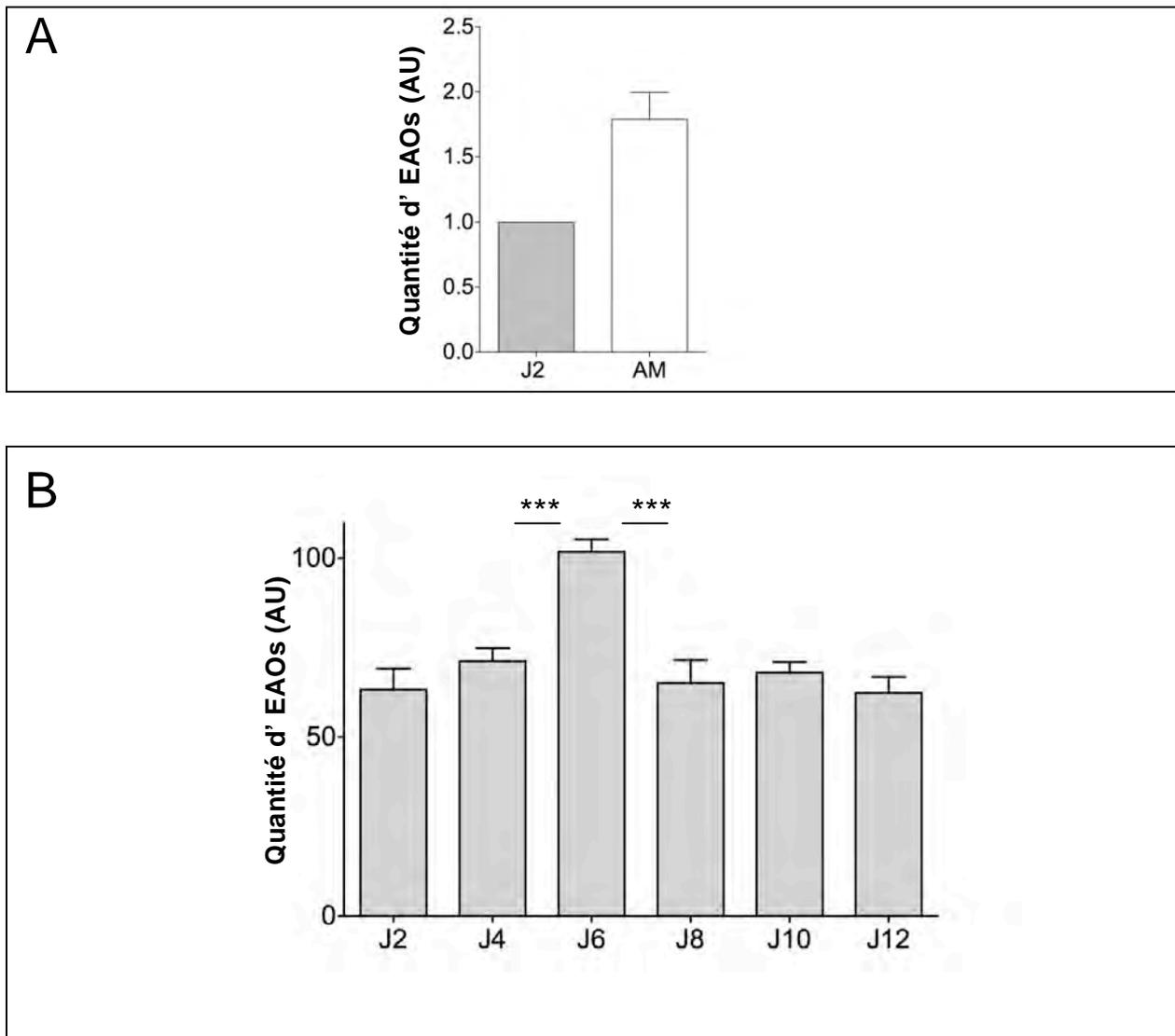
spectrofluorométrie. Une préincubation des cellules à J2 pendant 1h avec de l'Antimycine, un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire et connu pour induire un stress oxydatif mitochondrial, provoque une augmentation du taux d'oxydation de la sonde témoignant de la validité de notre test (Fig.7A). Une élévation significative du taux d'oxydation de la sonde est observée à J6, traduisant un accroissement transitoire de près de 35% du niveau des EAOs (Fig.7B). Au delà, la quantité de fluorescence retourne à un niveau voisin de celle observée à J2. L'augmentation transitoire à J6 du niveau des EAOs a lieu au même moment que l'élévation transitoire du potentiel de membrane mitochondrial suggérant qu'elle résulte d'une augmentation du fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Une incubation de 6h avec 2 types d'anti-oxydants, le Glutathion et le Trolox (analogue de la vitamine E), diminue significativement le taux d'oxydation de la sonde sans toutefois l'inhiber totalement (Fig.8A et B). L'analyse morphologique par ImageJ des mitochondries, après un traitement des neurones à J6 pendant 6h au Trolox qui induit 50% de diminution du taux d'oxydation de la sonde (Fig9A), ne révèle aucun effet sur la taille des mitochondries (Fig.9B).

Le caractère transitoire de l'augmentation des EAOs au cours de la maturation neuronale, suggère qu'il pourrait s'agir d'une voie de signalisation cellulaire. Actuellement, un des acteurs privilégiés reliant la maturation neuronale à la régulation du niveau des EAOs, est le facteur de transcription NRF2 (Kosaka et al., 2010; Zhao et al., 2009a). Nous avons donc analysé la localisation intracellulaire de NRF2 à J4, J6 et J8 par immunocytochimie. Une translocation nucléaire reflète l'activation de sa voie de signalisation.

À J4, 10% des neurones présentent une translocation nucléaire du facteur NRF2, phénomène qui double à J6 et revient à 10% à partir de J8. De nouveau, on assiste à un phénomène transitoire avec un accroissement du nombre de cellules présentant une translocation nucléaire de NRF2 à J6 (Fig.10A et B).

*Nous avons mis en évidence une augmentation transitoire de la quantité des EAOs au cours de la maturation neuronale ex vivo. Cette augmentation est corrélée à une augmentation transitoire du taux de translocation nucléaire du facteur de transcription NRF2, suggérant la mise en place d'une signalisation NRF2 dépendante au cours de la maturation des neurones ex vivo. La diminution du taux d'EAOs par un traitement avec un anti-oxydant est sans effet sur la morphologie des mitochondries, plaçant potentiellement l'augmentation*

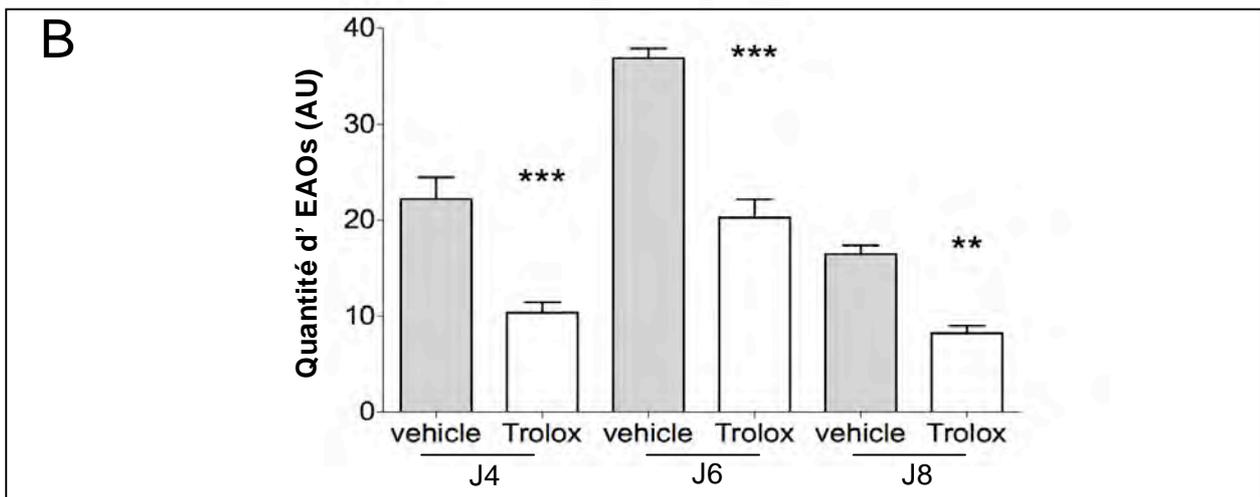
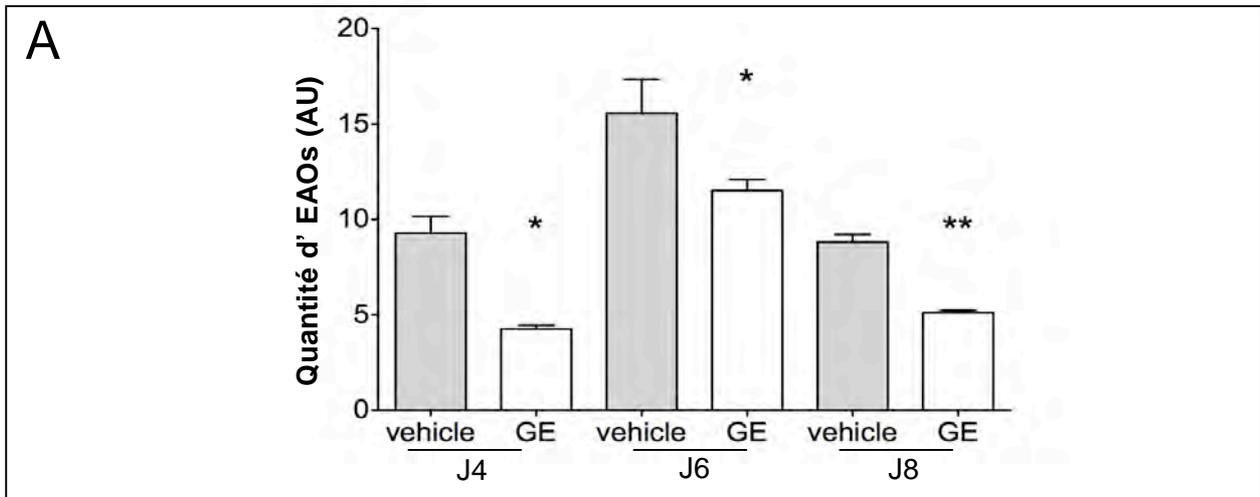


**Figure 7: Mesure de la quantité d'EOs.**

**A.** Les cellules corticales sont pré-traitées par le véhicule (gris) ou par 50nM d'Antimycine (blanc, AM) pendant 1H et sont ensuite incubées en présence de H2-DCFDA et la fluorescence émise a été quantifiée par spectrofluorométrie. Les résultats représentent la moyenne +/-SEM de trois expériences indépendantes.

Test t de Student, \* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

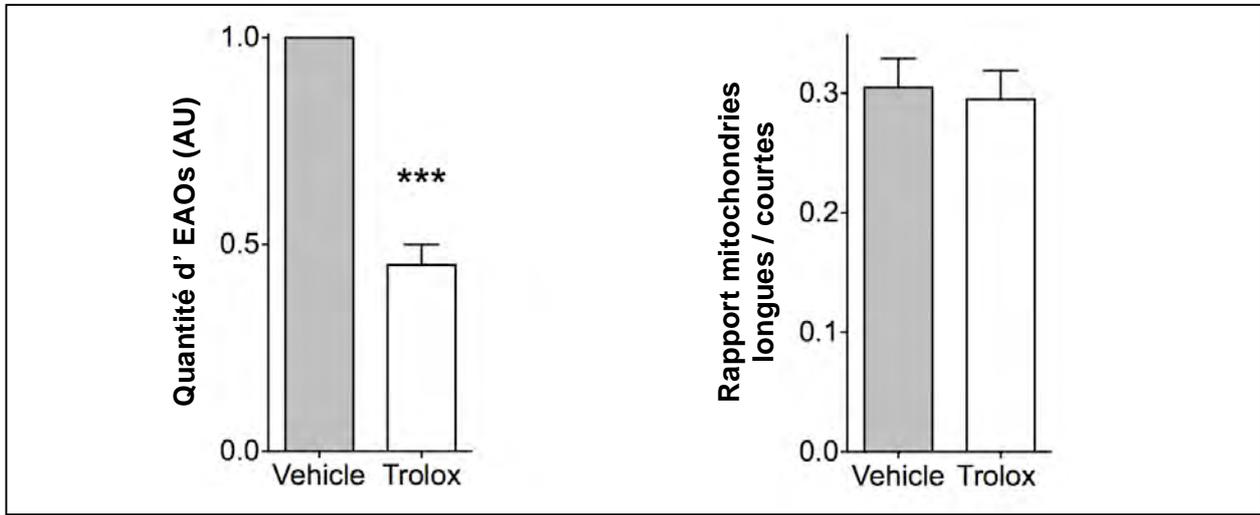
**B.** Les cellules corticales ont été incubées en présence de H2-DCFDA et la fluorescence émise a été quantifiée par spectrofluorométrie. Les résultats représentent la moyenne +/- SEM d'une expérience de 5 échantillons dépendants représentative



**Figure 8: Modulation de la quantité d'EAOs.**

**A:** Les cellules corticales sont pré-traitées à J6 par le véhicule (gris) ou par 1mM de glutathion pendant 2H (blanc, GE), ou 100µM de Trolox (**B**) pendant 6H , et sont ensuite incubées en présence de H2-DCFDA et la fluorescence émise a été quantifiée par spectrofluorométrie. Les résultats représentent la moyenne +/-SEM de trois expériences indépendantes.

Test t de Student, \* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

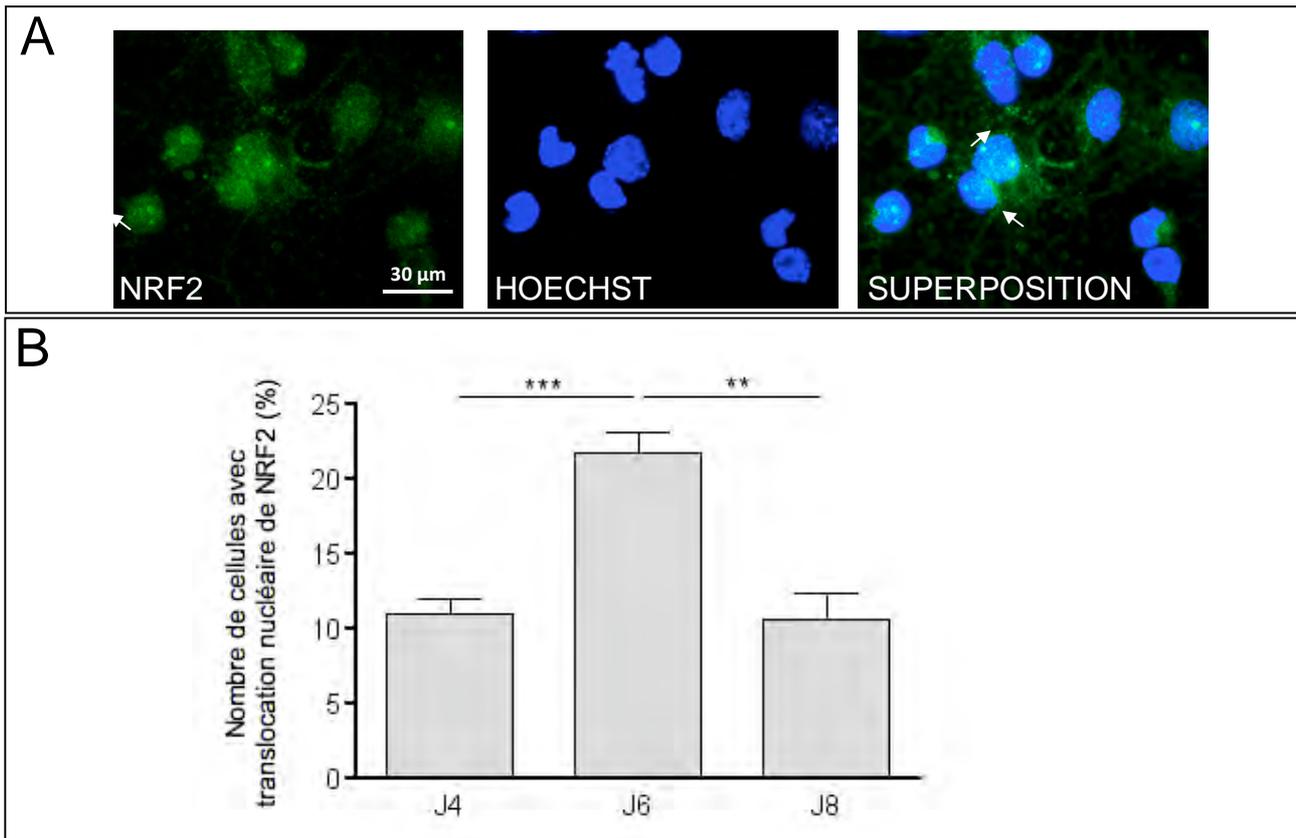


**Figure 9: Impact de l'antioxydant Trolox à J6 sur la quantité d'EAOs et sur la longueur des mitochondries.**

**A:** Le graphe montre la moyenne +/-SEM des valeurs après traitement de 6H avec le Trolox (100µM), normalisées à celles obtenues pour le véhicule, pour 6 expériences indépendantes. Test t de Student, \*\*\* : p<0,001.

**B:** Après immunodétection des mitochondries par le cocktail d'anticorps OXPPOS, dans les conditions véhicule ou Trolox, l'analyse morphométrique a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ.

L'histogramme montre les moyennes +/- SEM du rapport du nombre de mitochondries longues sur celles dites petites à J6 (3 expériences indépendantes).



**Figure 10: Evolution du pourcentage de translocation nucléaire de NRF2 au cours de la maturation neuronale**

**A:** La translocation de NRF2 dans le noyau (Hoechst, bleu) est visualisée par immunofluorescence grâce à l'anticorps anti-NRF2 (Vert).

**B:** Le graphe représente la moyenne +/-SEM du pourcentage de neurones dans lesquels le facteur de transcription NRF2 est transloqué dans le noyau, à J4, J6 et J8, pour 4 expériences indépendantes. Test T de Student; \*\* : p<0,01; \*\*\* : p<0,001). 150 cellules ont été comptées par condition et par expérience.

*transitoire des EAOs après le changement de morphologie des mitochondries au cours de la maturation des neurones.*

### **III- Influence d'OPA1 sur la morphologie et le fonctionnement des mitochondries dans les neurones, impact sur la maturation neuronale**

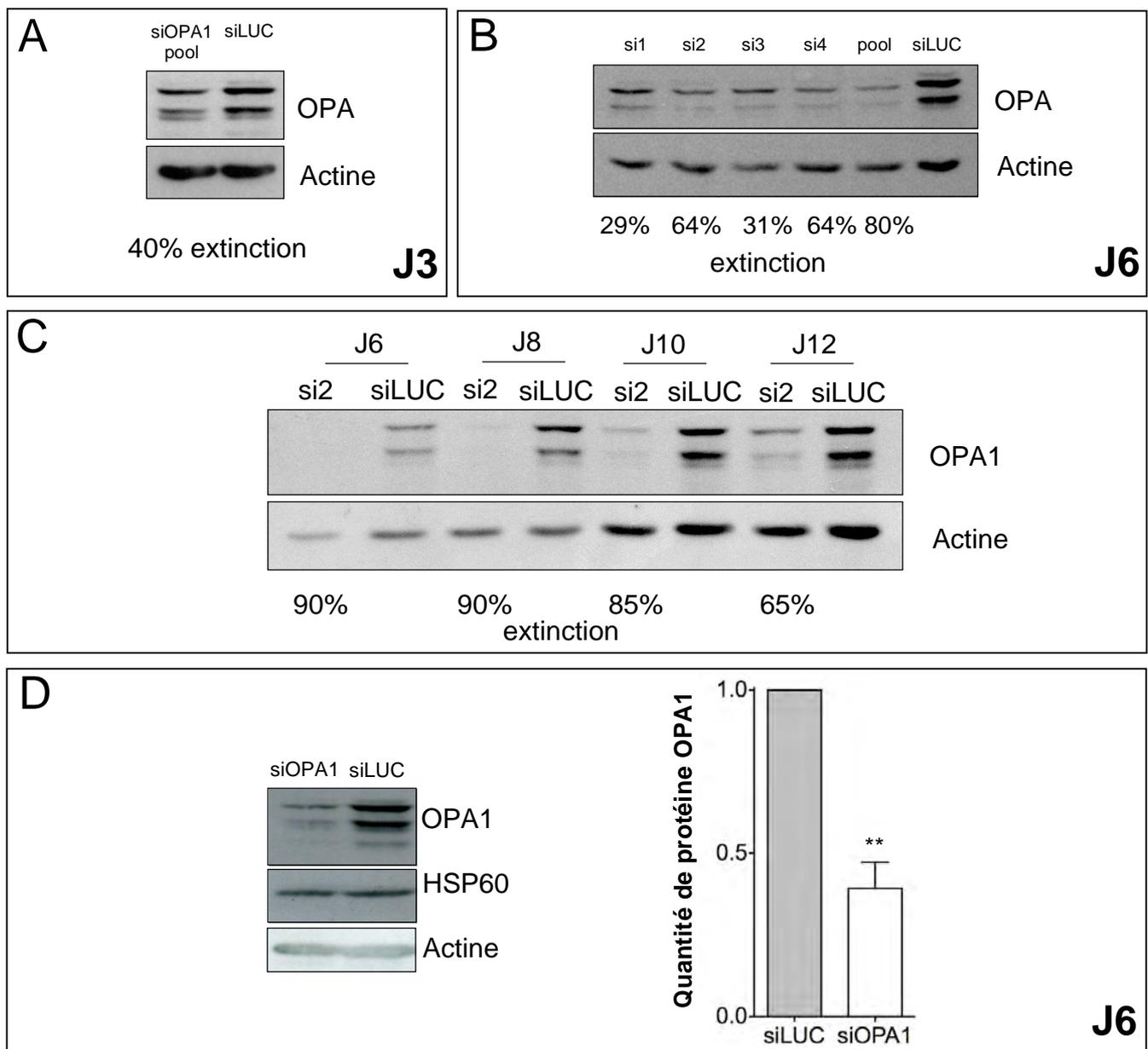
Nous avons montré l'existence de changements de morphologie des mitochondries associés à des modifications d'expression des acteurs de la dynamique mitochondriale au cours de la maturation des neurones corticaux *ex vivo*. Pour déterminer si la dynamique mitochondriale peut influencer la maturation des neurones, nous avons ciblé un des acteurs qui contrôlent ce processus, la protéine fusogène OPA1, objet d'étude du laboratoire. Nous avons choisi de diminuer l'expression d'OPA1. En effet, les mécanismes pathogènes majoritairement mis en jeu lors de l'ADOA-1, pathologie liée aux mutations de la dynamine, sont des processus d'haploinsuffisance.

#### **III-1- Mise en place de la stratégie d'extinction d'OPA1**

Pour inhiber l'expression d'OPA1 dans les neurones corticaux en culture primaire, nous avons utilisé une stratégie d'interférence à l'ARN. Des siARN ciblant la séquence des 8 variants d'épissage d'OPA1 (siOPA1), ou un siARN contrôle ciblant l'ARN de la luciférase (siLUC), ont été introduits par nucléofection dans les cellules corticales fraîchement dissociées (J0). Les neurones transfectés ont été cultivés de 3 à 12 jours. La quantité d'OPA1 dans les cellules a été détectée par Western blot avec des anticorps dirigés contre la dynamine. Dans le premier cas, des quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel Image J en utilisant comme standard de normalisation la protéine mitochondriale HSP60 ou l'actine.

Les premières expériences ont été réalisées en utilisant un mélange de 4 siARN OPA1 différents (siOPA1 pool) (Fig.11A). Dès 72h après transfection, la quantité d'OPA1 détectée par Western blot est diminuée de 40% par rapport aux cellules contrôles transfectées par le siLUC. 6 jours après transfection, la quantité de protéine OPA1 est réduite de 80% (Fig.11B).

Pour limiter d'éventuels effets non spécifiques des siARN, nous avons ensuite testé séparément les 4 siOPA1 présents dans le pool (si1-4) afin d'en sélectionner un. Parmi les 4 siARN du pool, les si2 et si4 sont les plus efficaces avec 64 % d'extinction après 6 jours de transfection (Fig11B). Une analyse cinétique de l'effet du si2 montre que l'extinction de la protéine OPA1 est effective jusqu'à 12 jours après la transfection (Fig.11C).



**Figure 11 : Evolution de l'expression d'OPA1 dans les neurones en culture après traitement par différents siARN à J0**

La transfection des siARN OPA1 ou luciférine dans des cellules corticales en suspension est réalisée à J0 par électroporation et l'expression de OPA1 (toutes isoformes) et de l'actine ou HSP60 a été suivie par Western blot complétée d'une quantification par ImageJ.

**A:** Effet du 'pool', ensemble de 4 siOPA1, et du siLuc contrôle sur la quantité d'OPA1 à J3. Quantification par normalisation à la quantité d'actine.

**B:** Effet du 'pool', ensemble de 4 siOPA1, de chaque siOPA1 individuellement et du siLuc contrôle à J6. Quantification par normalisation à la quantité d'actine.

**C:** Evolution de l'effet du siOPA1 numéro 2 sur la quantité d'OPA1 de J6 à J12. Quantification par normalisation à la quantité d'actine.

**D:** Evolution de l'effet du siOPA1 numéro 2 sur la quantité d'OPA1 de J6. Histogramme des moyennes +/- SEM des valeurs obtenues après normalisation à la quantité d'HSP60 (n=3).

Dans la suite du travail, nous avons utilisé le si2, dont nous avons analysé les effets à 6 jours de transfection. La figure 11D représente une analyse statistique de l'effet du siOPA1 sur la quantité de protéine OPA1 qui apparaît réduite de 61% +/- 8 par rapport aux cellules contrôles transfectées par le siLUC.

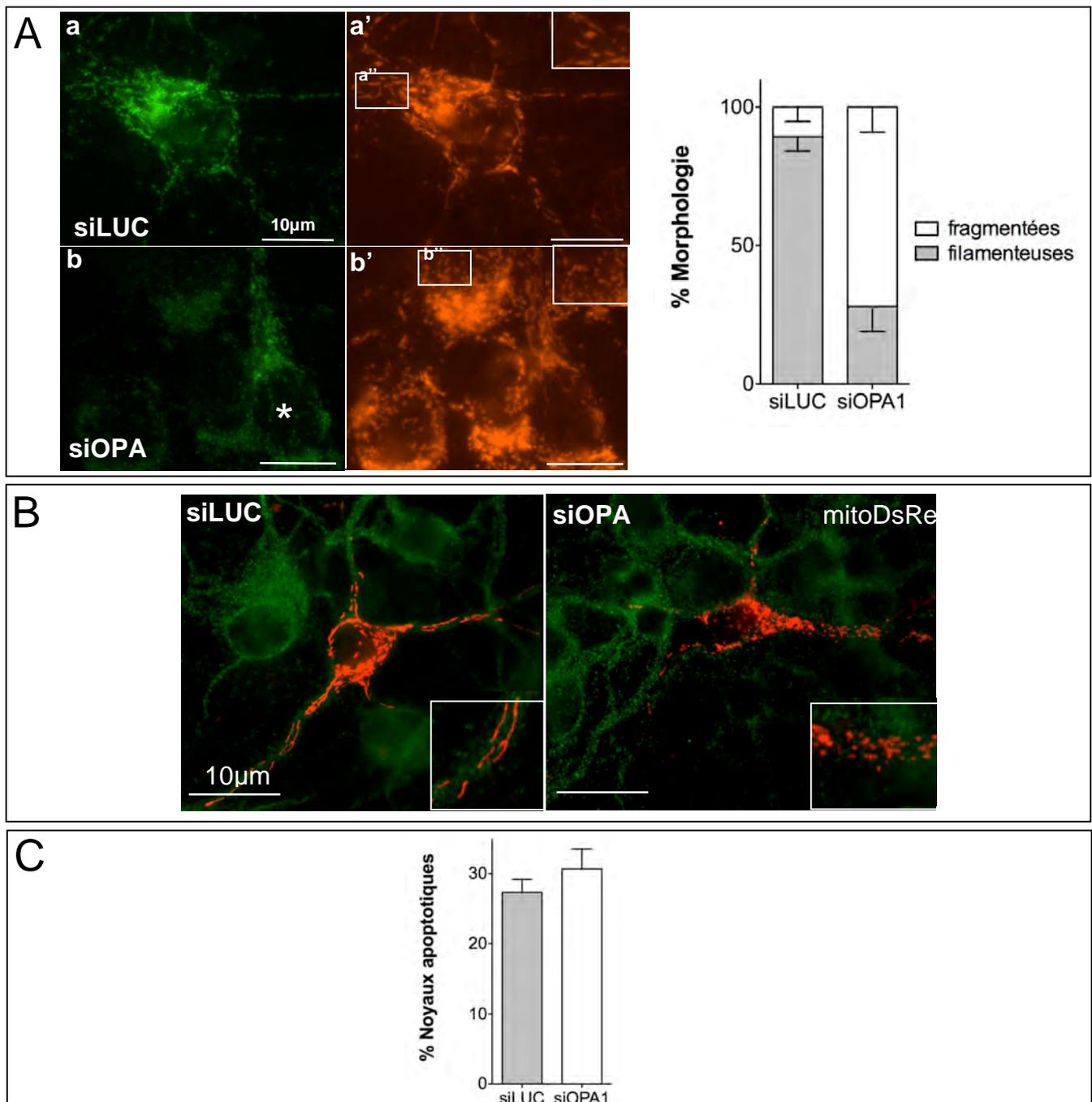
*Nous disposons donc d'une stratégie efficace de diminution de l'expression d'OPA1, dont nous avons étudié les différentes conséquences, 6 jours après transfection, au moment où ont lieu le pic de filamentation mitochondriale, l'élévation du potentiel de membrane mitochondrial, l'augmentation de la quantité d'EAOs et de translocation nucléaire de NRF2. De façon intéressante, le taux moyen d'extinction d'OPA1 obtenu, se rapproche des taux d'OPA1 mesurés dans des fibroblastes de patients atteints d'ADOA-1 ou dans des modèles de souris de cette rétinopathie (Davies et al., 2007; Olichon et al., 2007).*

### **III-2- Extinction d'OPA1 et morphologie mitochondriale**

Notre équipe a montré qu'une diminution de l'expression d'OPA1 provoque la fragmentation des mitochondries et la mort par apoptose de cellules HeLa (Olichon et al., 2003). Nous avons donc examiné les effets d'une diminution de la quantité d'OPA1 sur la morphologie du réseau mitochondrial et la viabilité des neurones corticaux.

La morphologie des mitochondries des cellules corticales transfectées par des siARN OPA1 ou LUC a été examinée après 6 jours de culture par microscopie à fluorescence à l'aide de l'anticorps OXPHOS (Fig.12A) ou de la protéine mitochondriale fluorescente MitoDsRed co-transfectée avec les siARN (Fig.12B). Les neurones et leur différents compartiments, dendrites ou axones, ont été visualisés par immunocytochimie respectivement grâce à l'anticorps anti-MAP2 ou anti-TAU (Fig.12B). La présence ou l'absence de la protéine OPA1 dans les neurones, a été visualisée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la dynamine (Olichon et al., 2003).

Les neurones traités par le siLUC possèdent en grande majorité (89% +/-5) un réseau mitochondrial filamenteux contrairement aux cellules traitées par le siOPA1 qui présentent des mitochondries fragmentées (72% +/- 9) (Fig.12A panel de droite). Des exemples représentatifs de cellules marquées par l'anticorps OPA1 (a) et présentant un réseau mitochondrial filamenteux visualisé grâce à l'anticorps OXPHOS (a') ou de cellules dont le marquage OPA1 est négatif (b) et qui arborent un réseau mitochondrial fragmenté (b') sont présentés en figure 12B panel de gauche. Les mitochondries fragmentées, visualisées par la MitoDsRed, sont distribuées de façon homogène dans les différents



**Figure 12 : Effet de l'extinction d'OPA1 sur la morphologie, la distribution des mitochondries et la mort neuronale à J6.**

**A:** Les mitochondries ont été visualisées par microscopie à fluorescence grâce à des anticorps dirigés contre l'ATP synthase (rouge, **a'**, **a''**, **b'** et **b''**) et contre la dynamine OPA1 (vert, **a** et **b**). Les pourcentages de cellules ayant un réseau mitochondrial fragmenté (blanc) ou filamenteux (gris) ont été déterminés après comptage sous microscope (n=3).

**a''** et **b''** sont des agrandissements des carrés visualisés en **a'** et **b'**. \* = cellule OPA1<sup>+</sup> à mitochondries filamenteuses autour de cellules OPA1<sup>-</sup> à mitochondries fragmentées.

**B:** Les mitochondries sont visualisées en microscopie de fluorescence après transfection d'un plasmide codant la protéine mitochondriale fluorescente MitoDsRed. Panneau de gauche, situation contrôle siLuc, mitochondries filamenteuses; panneau de droite; siOPA1, mitochondries fragmentées.

**C:** Histogramme des moyennes +/- SEM des pourcentages de noyaux apoptotiques dans les conditions siLuc et siOPA1 à J6.

compartiments neuronaux (dendrites, axones et soma) dans les cellules traitées par le siOPA1, comme montré ici pour les dendrites avec l'anticorps anti-MAP2.

L'analyse du nombre de noyaux apoptotiques, *ie* présentant une chromatine condensée et fragmentée, montre que le pourcentage d'apoptose spontanée n'est pas plus important dans les cellules transfectées par le siOPA1 que dans les cellules contrôles (Fig.12C). Sa valeur plutôt élevée pourrait être imputable au processus de nucléofection, dommageable pour les cellules.

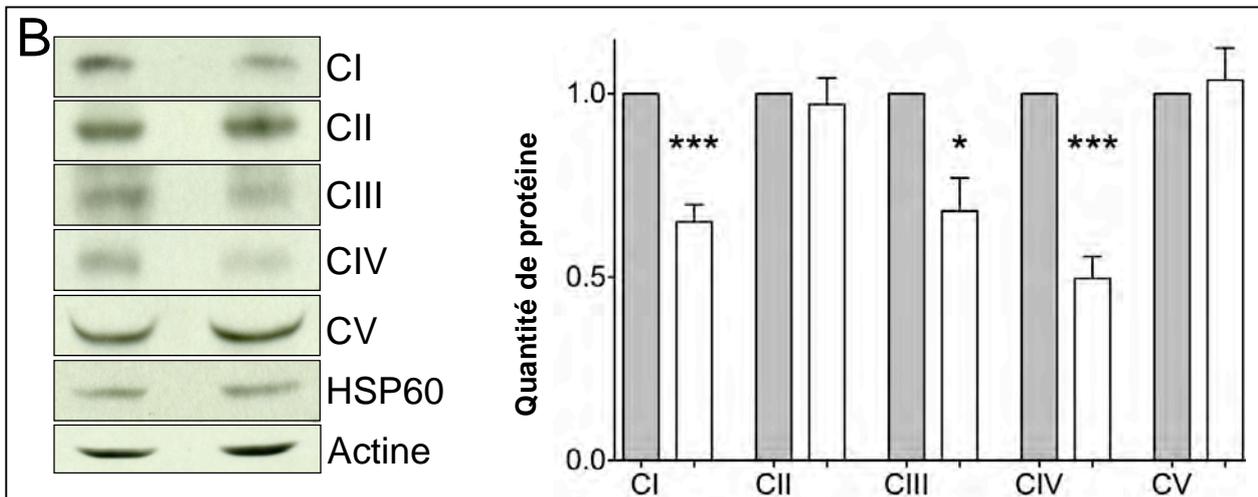
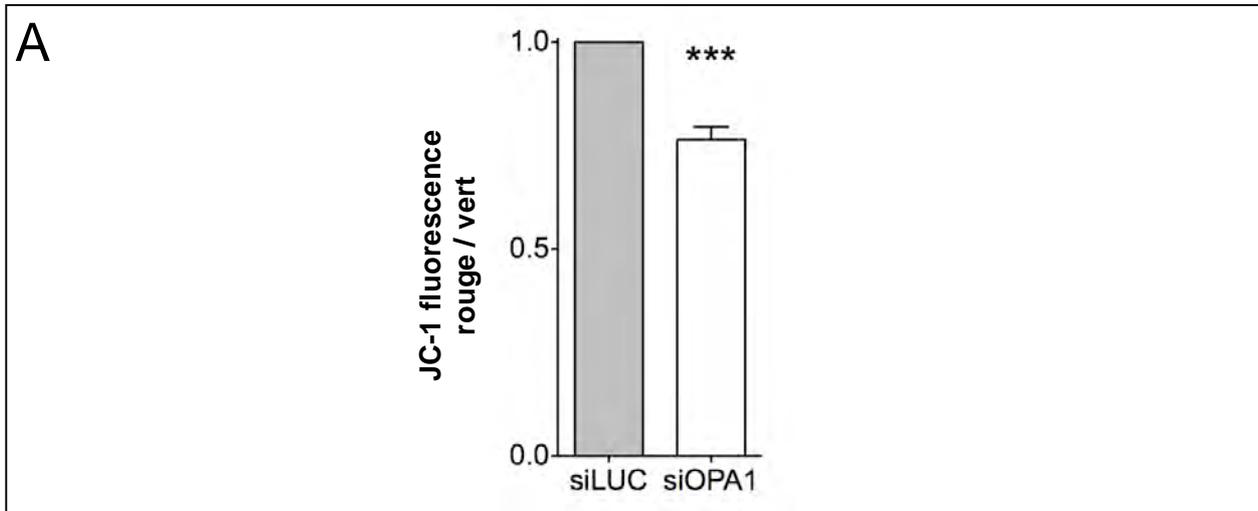
*Comme attendu, l'extinction de la protéine OPA1 provoque la fragmentation des mitochondries dans les neurones, sans affecter de façon drastique leur distribution. Dans les cultures corticales primaires de neurones, la perte d'OPA1 ne provoque pas d'apoptose spontanée.*

### **III-3- Extinction d'OPA1 et fonctions mitochondriales**

Notre équipe a montré que l'extinction d'OPA1 provoque dans les cellules HeLa une réduction du potentiel de membrane mitochondrial (Olichon 2003). De la même façon nous avons établi dans ce travail, qu'une diminution de l'expression de la dynamine dans les neurones s'accompagne d'une diminution significative de 27% du potentiel de membrane mitochondrial (Fig.13A). Pour cela des cultures corticales ont été transfectées à J0 par des siARN OPA1 ou LUC, puis incubées avec la sonde JC-1 pendant 20 minutes. Le rapport quantité de fluorescence rouge sur quantité de fluorescence verte a ensuite été mesuré après 6 jours de culture par spectrofluorométrie.

Comme démontré dans des fibroblastes déplétés en OPA1 (Chen et al., 2005), un défaut de respiration mitochondriale pourrait expliquer la diminution du potentiel de membrane mitochondrial observée dans les neurones. Ce défaut de respiration pourrait être le résultat d'une diminution de quantité et/ou d'activité de la chaîne respiratoire. Ainsi, nous avons évalué la quantité des cinq complexes composant la chaîne respiratoire. Pour cela, des cultures corticales ont été transfectées à J0 par des siARN OPA1 ou LUC, puis les protéines totales ont été extraites à J6 et analysées par SDS-PAGE et Western blot à l'aide de l'anticorps OXPHOS. L'analyse densitométrique, réalisée à l'aide du logiciel Image J, montre que l'extinction d'OPA1 provoque une diminution de la quantité de certaines sous-unités des complexes I, III et IV respectivement de 35% (+/- 4%), 32% (+/- 9%) et 50% (+/- 6%) (Fig.13B). Aucune différence n'est notée pour les complexes II et V.

*La perte d'OPA1 influence donc de manière spécifique la quantité des complexes I, III*



**Figure 13: Influence de l'extinction d'OPA1 sur le potentiel de membrane mitochondrial et l'expression des complexes respiratoires dans les cellules corticales.**

Après transfection des siARN OPA1 ou LUC dans des cellules corticales à J0, les différentes mesures sont effectuées à J6.

**A:** Histogramme de la moyenne +/- SEM du rapport de l'émission de fluorescence rouge/vert de la sonde JC-1 reflétant le potentiel de membrane mitochondrial, normalisé à la valeur contrôle (5 expériences indépendantes, Test t de Student, \*\*\* :  $p < 0,001$ ).

**B:** L'expression de sous-unités des complexes respiratoires (CI à CV) été suivie par Western blot. La protéine mitochondriale HSP60 a été utilisée comme témoin de charge. Le graphe représente les moyennes +/-SEM des valeurs issues de la quantification par ImageJ des Western blots, normalisées à la valeur contrôle ( $n=7$ , Test de Student, \* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$ ).

*et IV de la chaîne respiratoire et pourrait altérer le fonctionnement des mitochondries, mis en évidence ici par une diminution du potentiel de membrane mitochondrial.*

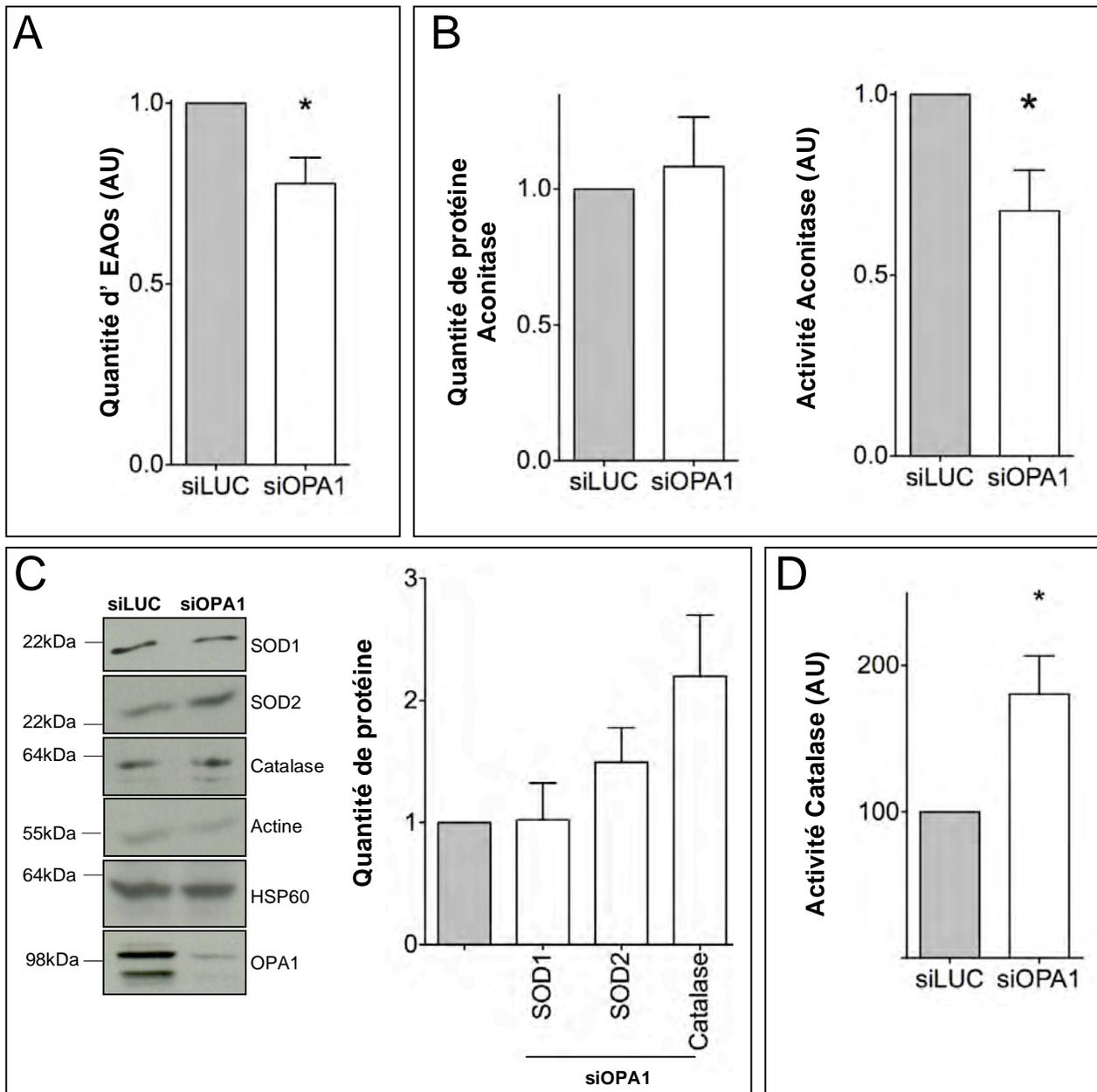
### **III-4- Extinction d'OPA1 et état redox**

La diminution du potentiel de membrane mitochondrial pourrait refléter un ralentissement global de l'activité de la chaîne respiratoire, qui par voie de conséquence produirait moins d'EOs. Au contraire, une perturbation du fonctionnement des complexes respiratoires, en particulier celui du I et du III pourrait, en provoquant une fuite d'électrons plus importante, mener à une production accrue des EOs (Droge, 2002). En conséquence une réponse antioxydante pourrait être mise en place pour piéger, efficacement ou non, l'excès d'EOs. Dans tous les cas, l'homéostasie redox de la cellule, qui résulte de la balance entre les systèmes producteurs des EOs et les systèmes antioxydants, serait modifiée. Nous avons donc analysé l'impact d'une diminution de l'expression d'OPA1 sur ces différents processus.

Dans un premier temps, nous avons analysé l'effet de la perte d'OPA1 sur la quantité des EOs par spectrofluorométrie à l'aide de la sonde H2-DCFDA, dans des neurones corticaux transfectés à J0 par des siOPA1 ou siLUC. Après 6 jours de mise en culture, le niveau des EOs diminue significativement de 22% (+/-7%) dans les neurones transfectés par le siOPA1 comparativement aux neurones traités par le siLUC (Fig.14A).

Une manière indirecte d'évaluer la production des EOs mitochondriales est de mesurer l'activité enzymatique d'une protéine intervenant dans le cycle de Krebs et sensible à l'anion superoxyde du fait de son centre Fer-S : l'aconitase. Cette enzyme permet de réaliser l'isomérisation stéréospécifique du citrate en isocitrate. Le test que nous avons utilisé pour évaluer l'activité de l'aconitase, est basé sur la mesure de la formation de coenzymes réduits NADPH résultant de la transformation de l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate par spectrofluorométrie à 340nm. L'activité de l'aconitase est diminuée de 33% (+/-11%) dans les neurones 6 jours après la transfection par le siOPA1 comparativement aux neurones traités par le siLUC (Fig.14B, panel de gauche). La quantité d'aconitase, estimée par Western blot à l'aide d'un anticorps dirigé contre l'enzyme reste elle identique (Fig.14B, panel de droite).

La diminution de l'activité aconitase suggère une production accrue d'EOs mitochondriales. Or le niveau global des EOs est diminué. Ceci pourrait indiquer que la cellule a mis en place une stratégie de défenses anti-oxydantes pour maintenir un niveau correct en EOs. Les enzymes des détoxification/dégradation des EOs, qui font partie de la



**Figure 14: Influence de l'extinction d'OPA1 sur les enzymes antioxydantes et sur la quantité d'EAOs.**

Après transfection des siARN OPA1 (blanc) ou LUC (gris) dans des cellules corticales à J0, les différentes mesures sont effectuées à J6.

**A:** Le graphe représente la moyenne +/- SEM de la concentration en EAOs (n=7); Test de Student, \* : p<0,05.

**B:** Le graphe de gauche représente la moyenne +/- SEM de la quantité de protéique aconitase (n=6) et le graphe de droite l'activité enzymatique de l'aconitase (n=5); Test de Student, \* : p<0,05.

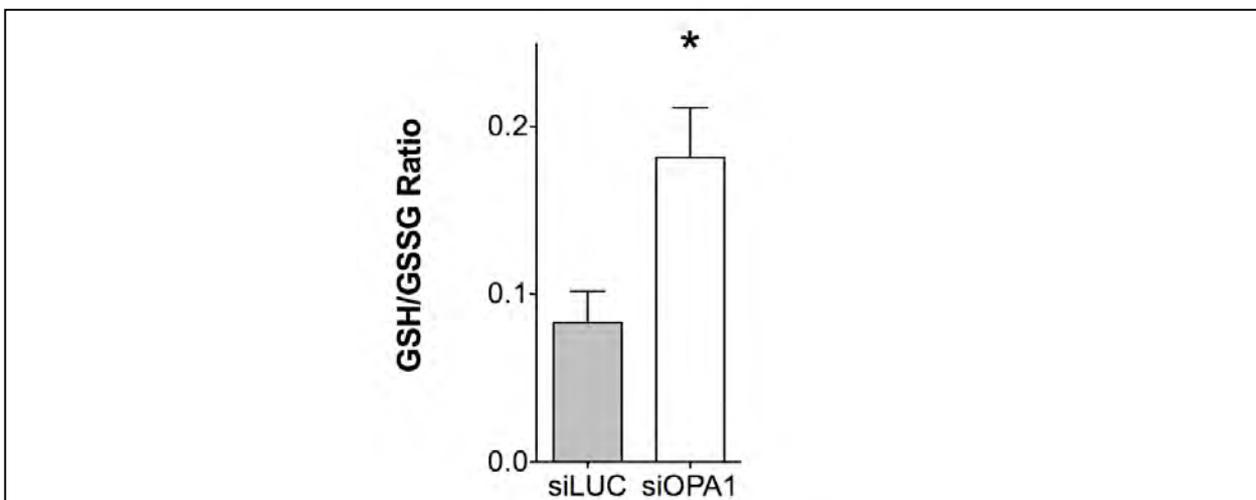
**C:** L'expression des enzymes antioxydantes SOD1, SOD2 et catalase a été suivie par Western blot. Les protéines cytosolique (Actine) et mitochondriale (HSP60) ont été utilisées comme témoin de charge. L'histogramme de droite représente la moyenne +/- SEM des valeurs issues de la quantification par ImageJ des Western blots (n=5, Test de Student).

**D.** Histogramme des moyennes +/- SEM de l'activité enzymatique de la catalase normalisée au contrôle (n=5; \* :Test t de Student, p<0,05).

machinerie antioxydante de la cellule, comprennent entre autres les SuperOxyde Dismutases (SOD1 et 2) et la catalase qui sont, lors d'un déséquilibre redox, sujettes à des régulations transcriptionnelles et traductionnelles. Nous avons dans un premier temps évalué la quantité de la protéine SOD1 (isoforme cytosolique ou présente dans l'espace intermembranaire mitochondrial dépendante du cuivre et du zinc), SOD2 (isoforme mitochondriale dépendante du manganèse) et catalase dans des neurones corticaux transfectés par des siOPA1 ou siLUC par Western blot à l'aide d'anticorps dirigés contre ces enzymes. Des quantifications ont été réalisées à l'aide du logiciel Image J en utilisant comme standard de normalisation la protéine mitochondriale HSP60 ou l'actine. 6 jours après transfection, la quantité de SOD1 ne montre aucune différence dans les deux conditions, alors qu'une augmentation non significative des quantités de catalase sont notées dans les neurones transfectés par les siOPA1 (Fig 14C). Nous avons ensuite souhaité évaluer l'activité de ces enzymes. L'activité catalase a été mesurée en dosant l'oxygène dégagé par la conversion de l' $\text{H}_2\text{O}_2$  en  $\text{H}_2\text{O}$  et en  $\text{O}_2$  (Fig.14D). Les neurones, en absence d'OPA1, ont une activité de la catalase augmentée d'un facteur 2 comparativement aux neurones à J6 traités par les siLUC. Malheureusement, nous n'avons pas été en mesure de quantifier les activités SOD. Ces enzymes intervenant dans la même voie de détoxification des EAOs, nous pouvons proposer que la détoxification enzymatique des EAOs est active. Ainsi, en dépit d'une production élevée des EAOs, les enzymes SOD2 et catalase tamponneraient les EAOs délétères pour la cellule. Ce qui irait dans le sens d'une mise en route d'une détoxification locale à la mitochondrie et par voie de conséquence, à une modification de l'état redox.

Nous avons donc souhaité évaluer l'état redox des neurones dont la quantité en OPA1 est diminuée en déterminant le niveau d'oxydation du glutathion. La régénération de la forme réduite du glutathion (GSH), dont 15 % de la quantité totale est importée du cytosol vers la mitochondrie, est en effet au centre de la régulation du potentiel redox par l'organelle (Aon et al., 2007). L'état redox dans les neurones transfectés par les siOPA1 a été évalué, en collaboration avec Anne Galinier (Galinier et al., 2006), en déterminant la quantité de glutathion réduit et de glutathion oxydé par HPLC (Fig.15). Après 6 jours de transfection, le ratio GSH/GSSG est augmenté d'un facteur 2,2 dans les neurones siOPA1 par rapport aux conditions siLUC, traduisant un déséquilibre de l'état redox.

*L'ensemble de ces résultats montre que la perte d'OPA1 perturbe l'équilibre redox de la cellule. Cette perturbation pourrait être liée à une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire entraînant une production accrue d'EAOs mitochondriales, comme en témoignent respectivement la diminution du potentiel de membrane mitochondrial et la*



**Figure 15: Influence de l'extinction de la protéine OPA1 sur l'état redox des neurones corticaux.**

Après transfection des siARN OPA1 (blanc) ou LUC(gris) dans des cellules corticales à J0, les différentes mesures sont effectuées à J6.

Le graphe représente la moyenne +/- SEM du rapport du GSH/GSSG dans les conditions de traitement par siLUC (gris) et de siOPA1 (blanc) de 4 expériences indépendantes.

Test t de Student, \* :  $p < 0,05$ .

*diminution de l'activité aconitase. La cellule lutterait contre un déséquilibre oxydatif en augmentant les quantités et les activités de la SOD2 et de la catalase et tamponnerait efficacement une production nocive d'EAOs comme en témoigne l'augmentation du ratio GSH/GSSG et la diminution du niveau global des EAOs.*

### **III-5- Extinction d'OPA1 et maturation des neurones**

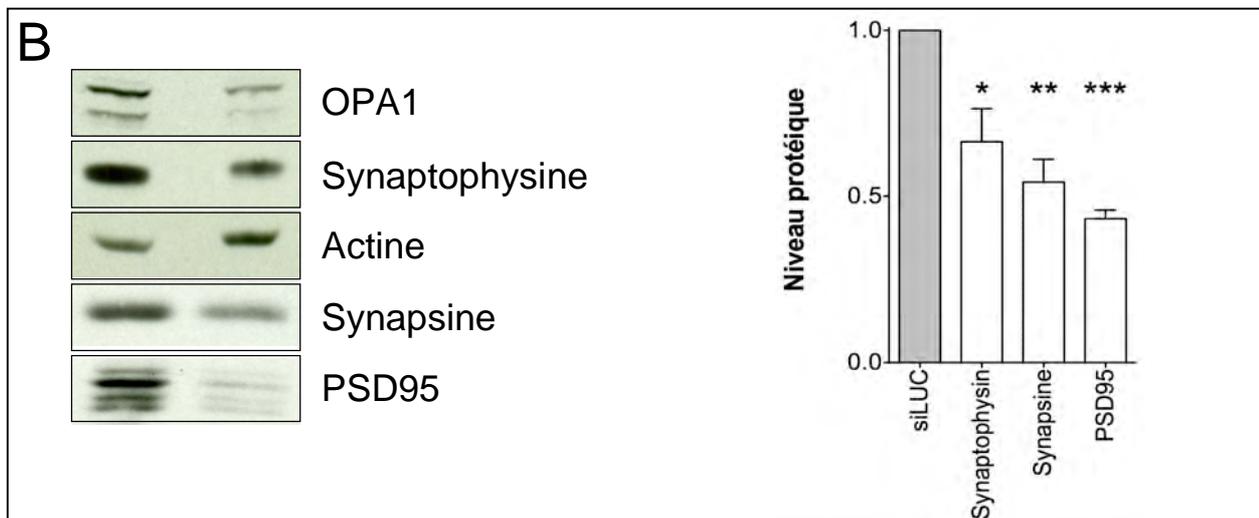
Les mitochondries, de par leur rôle énergétique, sont importantes au cours de la maturation neuronale pour la polarisation et la croissance axonale, pour le développement des dendrites et la mise en place et la plasticité des synapses (Mattson et al., 2008). D'autre part, il a été montré que la signalisation redox influence la maturation des neurones (Suzukawa et al., 2000). Une diminution d'OPA1, en entraînant une perturbation du fonctionnement mitochondrial mais également de l'état redox, pourrait donc altérer le processus de maturation neuronale.

Afin de répondre à cette question, nous avons en première approche, caractérisé l'impact de l'extinction d'OPA1 sur l'arborisation dendritique. L'effet de la perte d'OPA1 sur les prolongements neuronaux a été étudié par immunocytochimie à l'aide d'un anticorps anti-MAP2 qui permet de visualiser les dendrites et d'un anticorps anti  $\beta$ 3Tubuline qui met en évidence l'ensemble des neurites. Des études morphométriques avec le logiciel NeuronJ ont permis de classer les prolongements primaires qui partent directement du soma et secondaires qui naissent d'un embranchement en fonction de leur taille et de leur nombre d'embranchements (Fig.16A). Cette étude n'a révélé aucune différence au niveau de la longueur des neurites primaires et secondaires et du nombre d'embranchements primaires et secondaires dans les neurones transfectés par les siOPA1 comparativement aux neurones traités par les siLUC, 6 jours après transfection.

Nous nous sommes intéressés ensuite à l'impact d'OPA1 sur la synaptogenèse. La quantité de protéines synaptiques a été examinée par Western blot à l'aide d'anticorps spécifiques d'éléments pré-synaptiques (synaptophysine et synapsine) et post-synaptiques (PSD95) sur des cellules corticales transfectées par des siOPA1 ou siLUC après 6 jours de culture (Fig16B). La quantification des Westerns blots, grâce au logiciel ImageJ, indique une diminution de la quantité des trois marqueurs normalisés à la quantité d'actine : 33,5% (+/- 9%) pour la synaptophysine, 46% (+/-7%) pour la synapsine et 57% (+/-3%) pour PSD95 dans les cellules nucleofectées par un siOPA1 par rapport aux cellules contrôles.

*La perte d'OPA1 ne perturbe donc pas l'arborisation dendritique globale des neurones, mais provoque une diminution de la quantité des marqueurs protéiques*

A		siLUC	siOPA1
Dendrites primaires	< 17 $\mu\text{m}$	12% +/- 5,6	12% +/- 8
	17 – 34 $\mu\text{m}$	47,7% +/- 14,9	36% +/- 10,6
	34 - 51 $\mu\text{m}$	28,3% +/- 10,4	35,5% +/- 11,3
	> 51 $\mu\text{m}$	12% +/- 10	17,5% +/- 7,9
Dendrites secondaires	< 17 $\mu\text{m}$	44% +/- 10,4	36,7% +/- 15,8
	17 – 34 $\mu\text{m}$	43% +/- 5	49,7% +/- 10,4
	34 - 51 $\mu\text{m}$	12% +/- 5,5	10,7% +/- 7,3
	> 51 $\mu\text{m}$	1% +/- 1	3% +/- 2,1
Nombre embranchements primaires	>4	13,7% +/- 8,7	1% +/- 1
	5 et 7	53,3% +/- 4,4	66% +/- 14,2
	>8	33% +/- 6,4	33% +/- 13,6
Nombre embranchements secondaires	>2	14,7% +/- 9	21% +/- 5,7
	3 et 5	61,3% +/- 9,6	56,7% +/- 12,2
	>6	24% +/- 14,1	22,3% +/- 17,1



**Figure 16: Effets de l'extinction d'OPA1 sur l'arborisation des neurones corticaux et l'expression des protéines synaptiques.**

Après transfection des siARN OPA1 (blanc) ou luciférine (gris) dans des cellules corticales à J0, les différentes mesures sont effectuées à J6.

**A:** Pourcentages de répartition de la population dendritique en fonction de la taille des dendrites primaires et secondaires et du nombre d'embranchements primaires et secondaires, dans les conditions siLuc et siOPA.

**B:** L'expression de protéines pré-synaptiques (synaptophysine, synapsine) et post-synaptique (PSD95) ont été suivies par Western blot dans les conditions siLuc et siOPA. La protéine cytosolique Actine a été utilisée comme témoin de charge. Le graphe représente les moyennes +/- SEM des valeurs issues de la quantification par ImageJ des Western blots, normalisées à celles du contrôle; Test t de Student; \* :  $p < 0,05$ ; \*\* :  $p < 0,01$ ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

*représentatifs des éléments pré- et post-synaptiques, suggérant une diminution du nombre de synapses.*

#### **IV- Influence d'OPA1 sur la transmission synaptique**

Nous avons montré que l'extinction d'OPA1 provoque une diminution de la quantité de protéines essentielles des compartiments pré- et post-synaptiques au cours de la maturation des neurones. Cela pourrait indiquer un défaut de mise en place des synapses et, partant, une altération de la transmission synaptique. Nous avons donc étudié l'impact de l'inactivation d'OPA1 sur la transmission synaptique par électrophysiologie et ce, en collaboration avec une spécialiste du domaine, Pascale Chavis (INMED, Luminy).

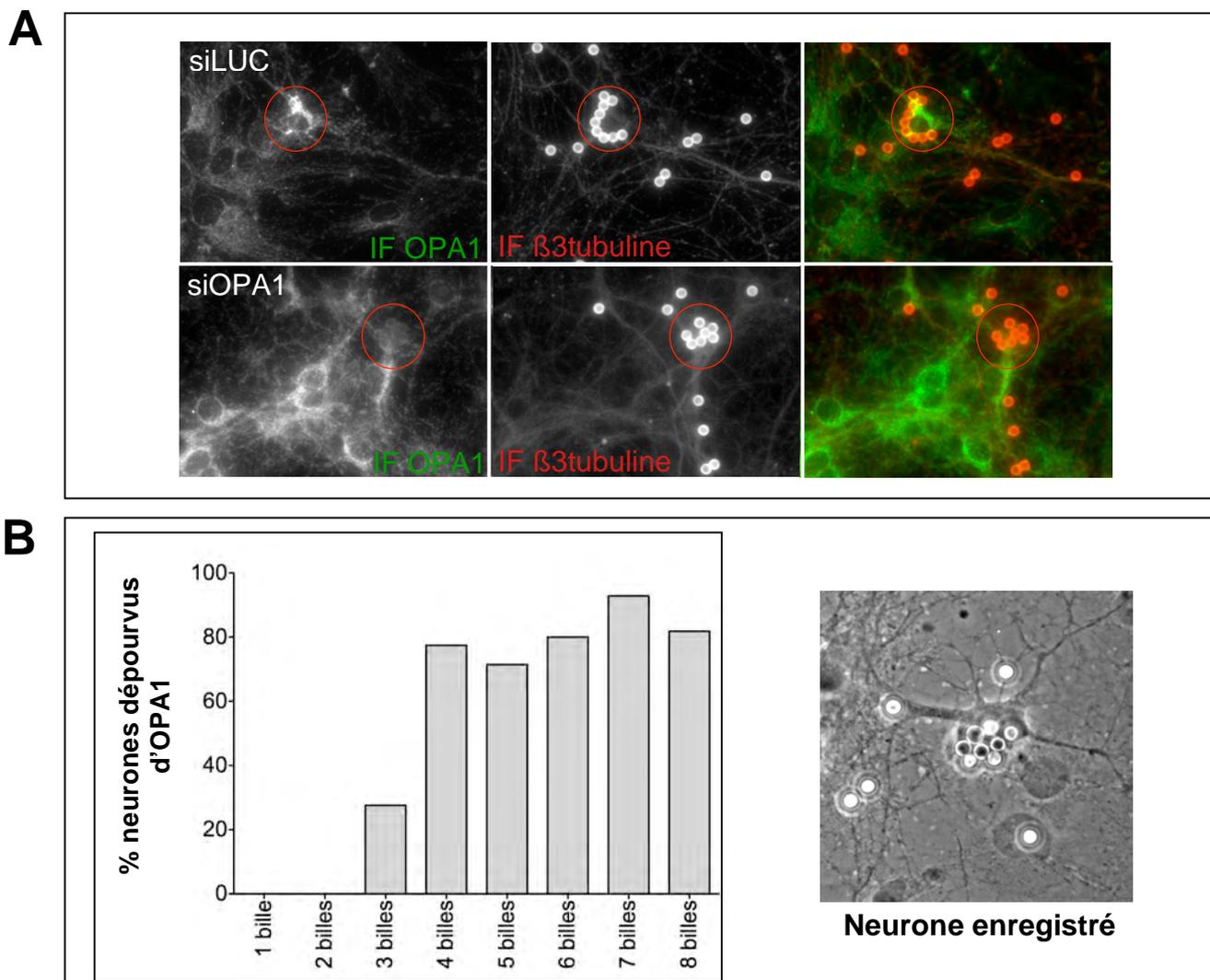
##### **IV-1- Système expérimental**

###### IV-1-1- Culture primaire de neurones corticaux murins post-nataux

Afin d'anticiper de futures études sur des lignées transgéniques murines, nous avons choisi de poursuivre nos recherches sur un modèle de neurones corticaux de souris en culture primaire. Les cultures ont été réalisées à partir de cortex de souriceaux post-nataux P0 dissociés enzymatiquement et mécaniquement. Etant donné le stade de développement auquel les cortex sont prélevés, la culture est composée en proportions égales de neurones et de cellules gliales (Sinagra et al., 2005).

La diminution de la protéine OPA1 par interférence ARN a été réalisée avec le siARN2 sélectionné pour les neurones de rat, qui s'hybride parfaitement avec les ARN messagers OPA1 de souris.

Pour ne pas interférer avec la maturation neuronale dès la mise en culture, nous avons utilisé la technique de transfection chimique pour introduire les siARN dans les neurones après 5 jours de culture. Or, cette technique ne permet que 5 à 10 % d'efficacité. Pour pouvoir procéder aux enregistrements électrophysiologiques, il était donc indispensable de repérer les neurones transfectés dans lesquels l'expression d'OPA1 est inhibée. Pour cela, nous avons procédé à une co-transfection des siARN avec un plasmide « traceur » qui code pour la protéine CD4, localisée à la surface membranaire et qui n'est pas exprimée de manière endogène par les neurones. Etant donné le rapport utilisé (150 picomoles siARN pour 500 nanomoles de vecteur pour 600 000 cellules), calqué sur la méthode de traceur classique pour les co-transfections de plasmide, les neurones qui exprimeront cette protéine devraient avoir également été transfectés par le siARN. La liaison d'anticorps couplés à des billes de polystyrène à la protéine CD4, a permis de sélectionner les neurones transfectés



**Figure 17: Caractéristiques des neurones co-transfectés avec le traceur CD4 et les siOPA1 ou siLUC.**

Avant chaque enregistrement, les neurones sont incubés 10 minutes en présence d'anticorps qui reconnaissent la protéine CD4 exprimée à la membrane plasmique. Ces anticorps sont couplés à des billes. Le nombre de billes au niveau du soma est corrélé à l'extinction de la protéine OPA1 visualisée par immunofluorescence.

**A:** Images d'immunofluorescence indirecte d'OPA1 dans les neurones visualisés par l'immunodétection de la  $\beta$ 3tubuline. Les billes sont révélées par la liaison de l'anticorps secondaire anti-souris.

**B:** Le graphe représente le pourcentage de neurones dans lesquels l'expression d'OPA1 est inhibée en fonction du nombre de billes à J9 (140 neurones). L'encart représente un aperçu en microscopie à lumière transmise d'un neurone porteurs de plusieurs billes.

par le traceur. Pour déterminer si, dans les neurones possédant le traceur, la quantité de protéine OPA1 était diminuée, nous avons réalisé une immuno-détection avec l'anticorps anti-OPA1 et analysé l'état du réseau mitochondrial et le niveau d'expression d'OPA1 en fonction du nombre de billes fixées sur le soma (Fig.17A). Une corrélation entre le nombre de billes et le niveau d'extinction d'OPA1 a ainsi été établie. À partir de 4 billes, 70% des neurones transfectés ne contiennent plus la protéine OPA1 (Fig.17B), ce qui confirme que le traceur est introduit en quantité proportionnelle aux siARN. Ainsi, nous avons retenu le critère du nombre de billes supérieur ou égal à 5, pour procéder à l'enregistrement des propriétés électrophysiologiques des neurones qui en sont porteurs.

Nous avons analysé les conséquences sur la transmission synaptique entre les jours 8 et 10 de mise en culture des neurones, intervalle au cours duquel ces derniers sont en pleine maturation neuronale.

#### IV-1-2- Patch-clamp : enregistrement 'cellule entière'

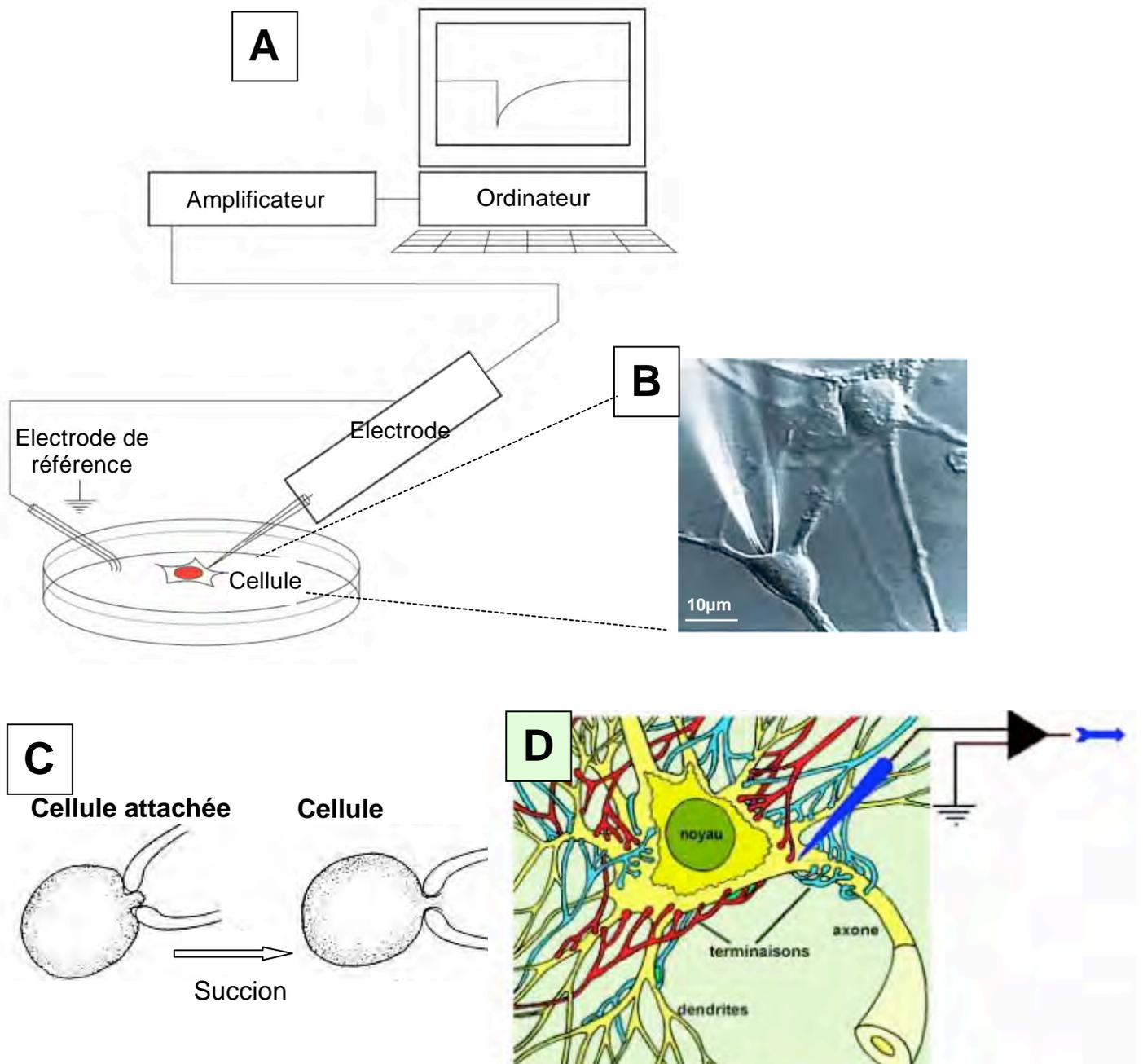
La technique d'électrophysiologie permet d'enregistrer les courants électriques membranaires générés lors de la transmission synaptique, puis de déterminer quels compartiments pré- et post-synaptiques et/ou quels acteurs protéiques (récepteurs, transporteurs, ...) peuvent être à l'origine d'éventuelles modifications du signal. La technique électrophysiologique de patch-clamp en configuration « cellule entière » est la technique de choix pour l'étude macroscopique des courants membranaires. Cette technique consiste à mettre en continuité électrique une micropipette de verre, remplie d'une solution ionique de composition définie avec l'intérieur de la cellule enregistrée comme illustré en figure 18. Nous avons utilisé cette technique afin d'enregistrer les courants post-synaptiques, excitateurs et inhibiteurs, en condition de potentiel ('voltage') imposé.

Deux types de courants ont été étudiés : les courants spontanés et les courants miniatures. Chacun des courants a été mesuré au niveau du soma du neurone.

Les courants spontanés proviennent de la libération de neurotransmetteurs induite par les potentiels d'actions (PA) pré-synaptiques (Fig 19).

Les courants miniatures proviennent de la libération aléatoire de neurotransmetteurs dans la fente synaptique sans induction préalable par des potentiels d'actions. Pour les mesurer, on réalise un traitement à la tétrodotoxine (TTX) qui permet l'inhibition des courants sodiques responsables de la genèse des PA (Fig 19).

Dans nos conditions, les courants spontanés et miniatures sont enregistrés grâce à un amplificateur de type AxoPatch et les analyses sont effectuées par l'intermédiaire du



**Figure 18 : Schéma explicatif de la technique d'enregistrement électrophysiologique sur cellule entière**

**A:** Schéma du dispositif expérimental reliant la cellule enregistrée via une électrode à un amplificateur puis à un ordinateur. Une électrode de référence permet de mesurer les différences de potentiel avec le milieu externe.

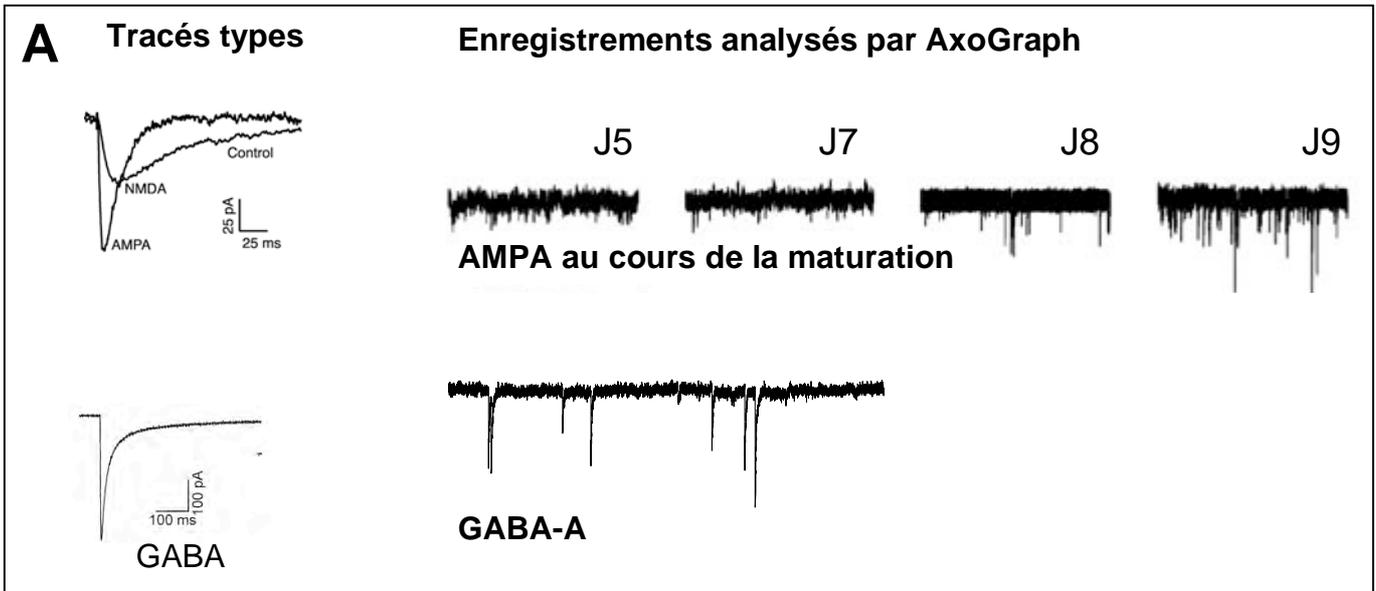
**B:** Représentation en microscopie à transmission (Contraste de phase) de neurones en culture, l'un d'eux étant en contact direct avec une électrode.

**C:** Schéma de l'évolution entre la configuration « cellule attachée » où l'électrode est apposée à la cellule et, après succion (au sens propre), la configuration « cellule entière » où l'intérieur de l'électrode est en contact avec l'intérieur de la cellule.

**D:** Schéma représentatif d'un neurone enregistré représentant les connexions synaptiques entre les dendrites et l'axone de ce neurone et les neurones adjacents.

## Analyse des tracés par le logiciel AxoGraph.

Paramètres étudiés : Fréquence d'apparition des événements et Amplitude des événements.



## **B** Courants spontanés :

Courant ionique NMDA : inhibition AMPA et GABA (CNQX et Bicuculline)

Courant ionique AMPA : inhibition NMDA et GABA (APV et Bicuculline)

Courant ionique GABA : inhibition NMDA et AMPA (APV et CNQX)

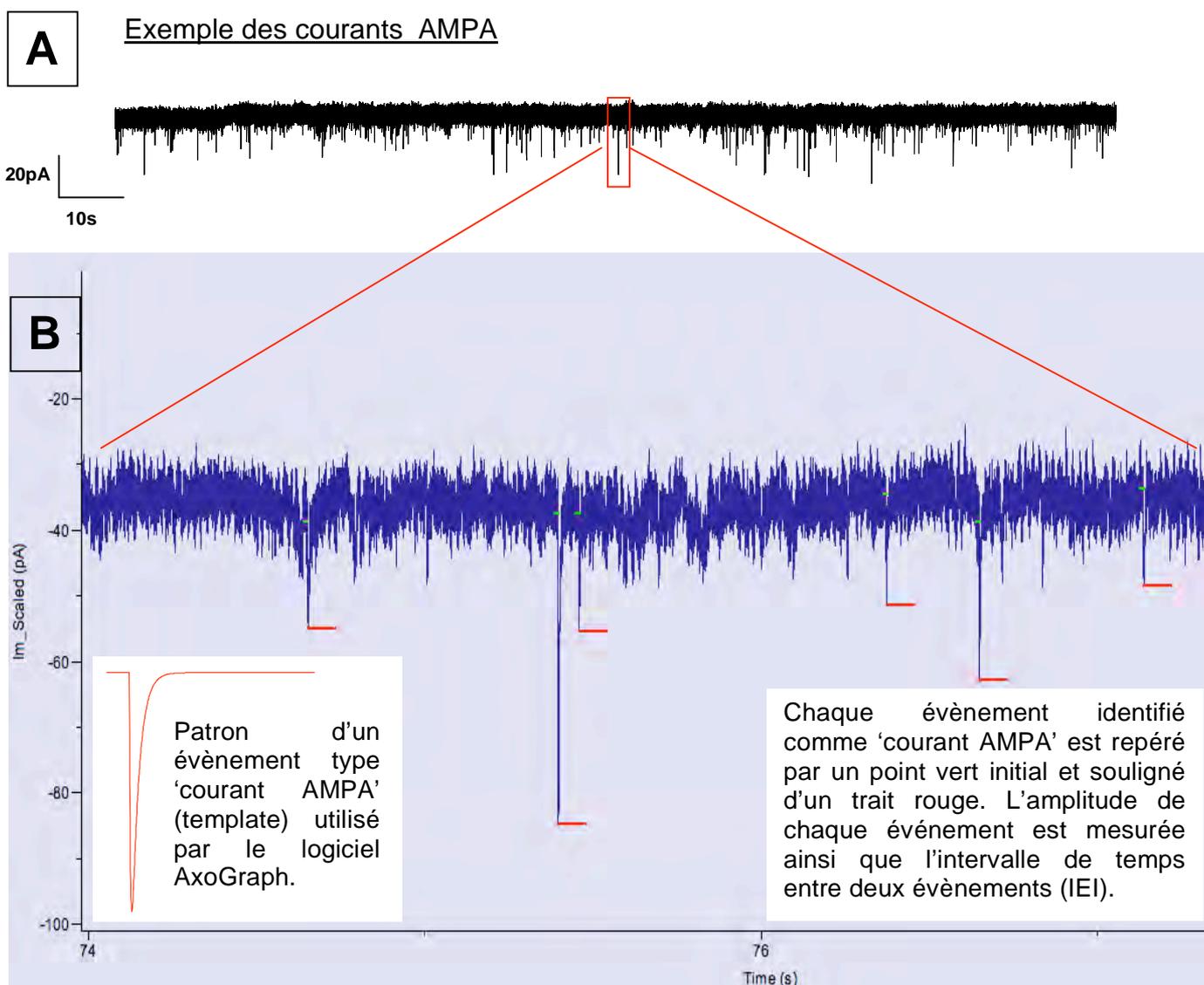
### Courants miniatures :

Conditions identiques + Tétrotoxine (TTX)

## **Fig 19: Illustration des courants enregistrés.**

A: Illustration des tracés types de courants excitateurs et inhibiteur (sur la partie de gauche), utilisés par le logiciel Axograph pour repérer les caractéristiques de ces courants dans les tracés bruts (représentés sur la partie droite) pour les AMPA en fonction du temps en culture et pour les GABA à J9.

B: Description des conditions expérimentales permettant l'enregistrement des courants individuels spontanés et miniatures.



**Fig 20: Illustration de l'analyse par Axograph des courants enregistrés.**

**A:** Exemple des courants AMPA enregistrés pendant 210 secondes.

**B:** L'analyse des courants par Axograph est basée sur l'utilisation d'un patron (template), configuré pour repérer les courants d'un type donné, illustré ici par le patron AMPA, sur un agrandissement du tracé premier. A partir d'un point donné (illustré ici en vert), le tracé des courants est analysé pendant un temps donné (indiqué par un trait rouge parallèle à l'abscisse) pour déterminer l'amplitude de chaque évènement ainsi que l'intervalle de temps entre deux évènements successifs.

logiciel AxoGraph. L'analyse par le logiciel AxoGraph permet de détecter les courants électriques (événement) provenant de l'ouverture des canaux ioniques, d'évaluer l'intervalle de temps entre chaque événement ainsi que leur amplitude, comme l'illustre la figure 20. L'ouverture de canaux de type NMDA, AMPA et GABA (pour se limiter à ceux que nous avons enregistrés) déclenche un courant dont le tracé en fonction du temps répond à des critères de cinétique d'ouverture et de fermeture, et d'amplitude bien particuliers qui ont été modélisés sous forme de patron (template), illustré figure 20B pour le tracé type AMPA. Ce patron permet de déterminer l'occurrence de ces courants sur une période donnée ainsi que leur amplitude.

Les résultats des analyses ont été représentés par un graphique de la distribution des fréquences cumulées de chacun des paramètres étudiés c'est-à-dire, ici, l'intervalle de temps entre deux événements et l'amplitude des événements. Cette représentation permet de mettre en évidence la distribution statistique des caractéristiques (fréquence ou amplitude) des courants enregistrés. En complément, un des critères utilisés est la moyenne de la fréquence d'apparition des courants ou de leur amplitude. De fait, le seul critère de moyenne, s'il peut être informatif en cas de variation importante entre deux situations expérimentales, ne permet pas de rendre compte de variations discrètes de distribution réservée à une sous-partie de l'échantillonnage. Un critère supplémentaire d'analyse que constitue le nombre total d'événements est en cours d'analyse. Nous présenterons donc systématiquement les moyennes aux côtés des distributions cumulatives de fréquence.

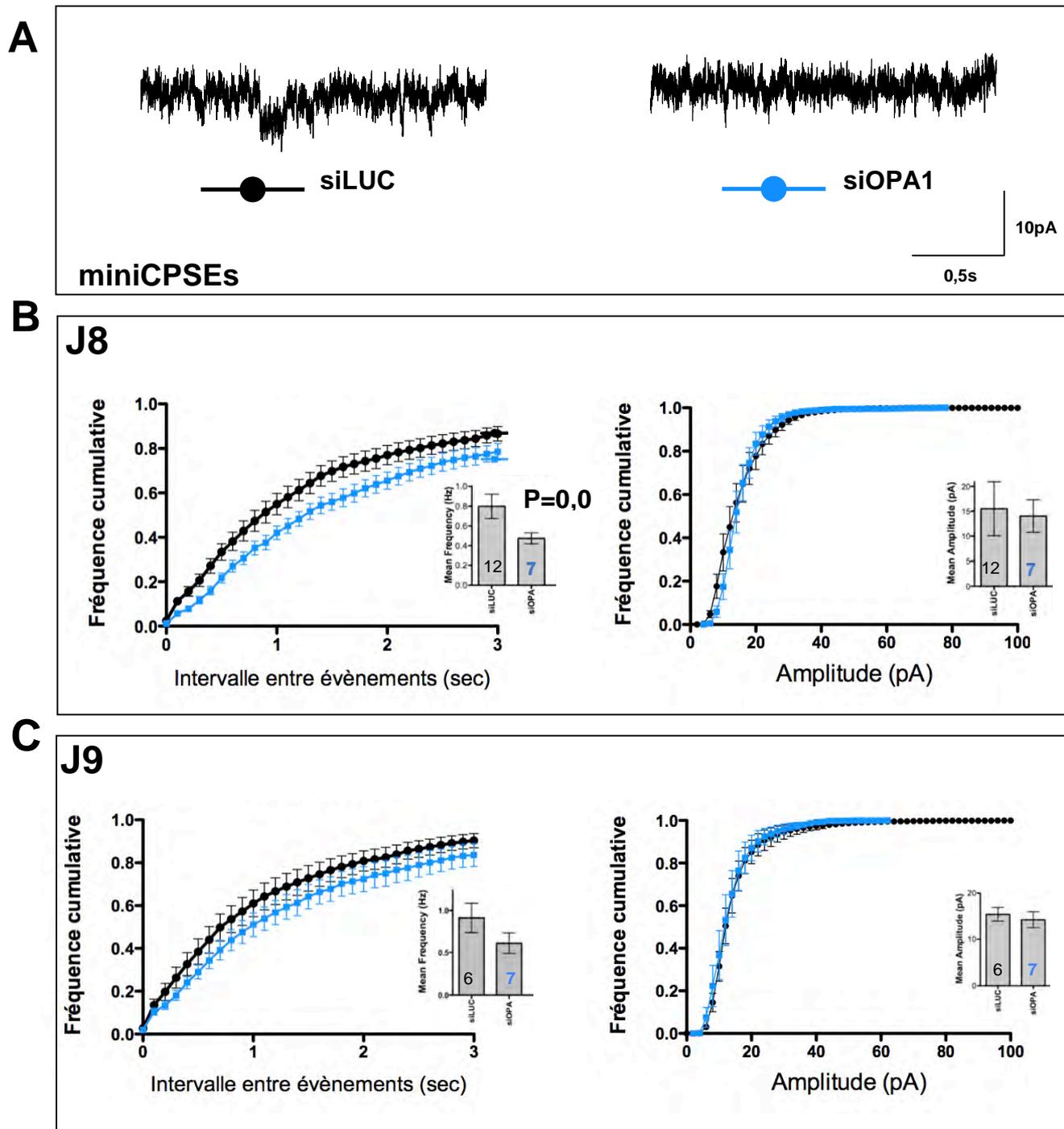
Nous nous sommes intéressés dans un premier temps à la transmission excitatrice glutamatergique traduite par les courants entrants des récepteurs canaux NMDA et AMPA et, dans, un second temps, à la transmission inhibitrice traduite par les courants GABA.

## **IV-2- Etude de la transmission glutamatergique**

Dans le cadre de la transmission glutamatergique, afin d'analyser les seuls courants NMDA, des antagonistes pharmacologiques des récepteurs AMPA et GABA-A (respectivement CNQX et Bicuculine) sont perfusés par gravité directement dans la chambre d'enregistrement, permettant ainsi de n'enregistrer que les courants dus à l'ouverture des canaux NMDA. De même, pour une analyse précise des courants dus aux récepteurs AMPA, l'ajout d'AP-5 ou acide 2-amino-5-phosphonopentanoïque bloque l'ouverture du canal NMDA.

### IV-2-1 Etude des courants excitateurs miniatures (mCPSE)

Les courants excitateurs miniatures ont été mesurés à J8 et J9 en présence de TTX.



**Figure 21: Influence de l'extinction d'OPA1 sur les courants miniatures NMDA.**

Après transfection des siARN dirigés contre OPA1 ou contrôles à J5, les enregistrements ont été faits à J8 et J9 .

**A:** Exemple de tracés de courants miniatures NMDA dans les conditions contrôle (noir) et siOPA1 (bleu).

**B et C:** Les graphes représentent la distribution cumulative des fréquences (+/- SEM) des intervalles entre évènements (graphe de gauche) et des valeurs d'amplitude (graphe de droite) pour les conditions de traitement par siOPA1 (bleu) et contrôle (noir), à J8 (B) et à J9 (C).

Un histogramme des moyennes (+/- SEM) est associé à chaque distribution.

*-Courants NMDA (Fig. 21) :*

À J8, la distribution des fréquences cumulées des intervalles entre les événements NMDA en l'absence d'OPA1 (siOPA1, courbe bleue) diffère de celle des contrôles (siLUC, courbe noire) (Fig.21B). La courbe bleue est décalée vers la droite et vers le bas du graphique, ce qui traduit une élévation de la durée entre l'apparition de deux événements. Comme la fréquence d'apparition des courants est l'inverse de l'intervalle de temps, la perte d'OPA1 provoque donc une diminution de fréquence des événements NMDA miniatures. La moyenne de la fréquence des événements dans les conditions siOPA1 est également diminuée mais de manière non significative par rapport aux contrôles ( $p=0,056$ ). D'autre part, les courbes représentant la distribution des fréquences cumulées des amplitudes dans le cas des neurones traités par les siOPA1 ou les siLUC, sont, elles, parfaitement superposées. Dans ce cas, la moyenne de l'amplitude des courants ne diffère pas entre les deux conditions.

Les résultats obtenus à J9 rappellent ceux de J8 (Fig.21C). Cependant, une variabilité importante entre les différentes cellules enregistrées nécessite d'augmenter le nombre d'expériences pour conclure définitivement quant à l'effet de la perte d'OPA1 sur la fréquence à ce stade de culture.

*-Courants AMPA (Fig. 22) :*

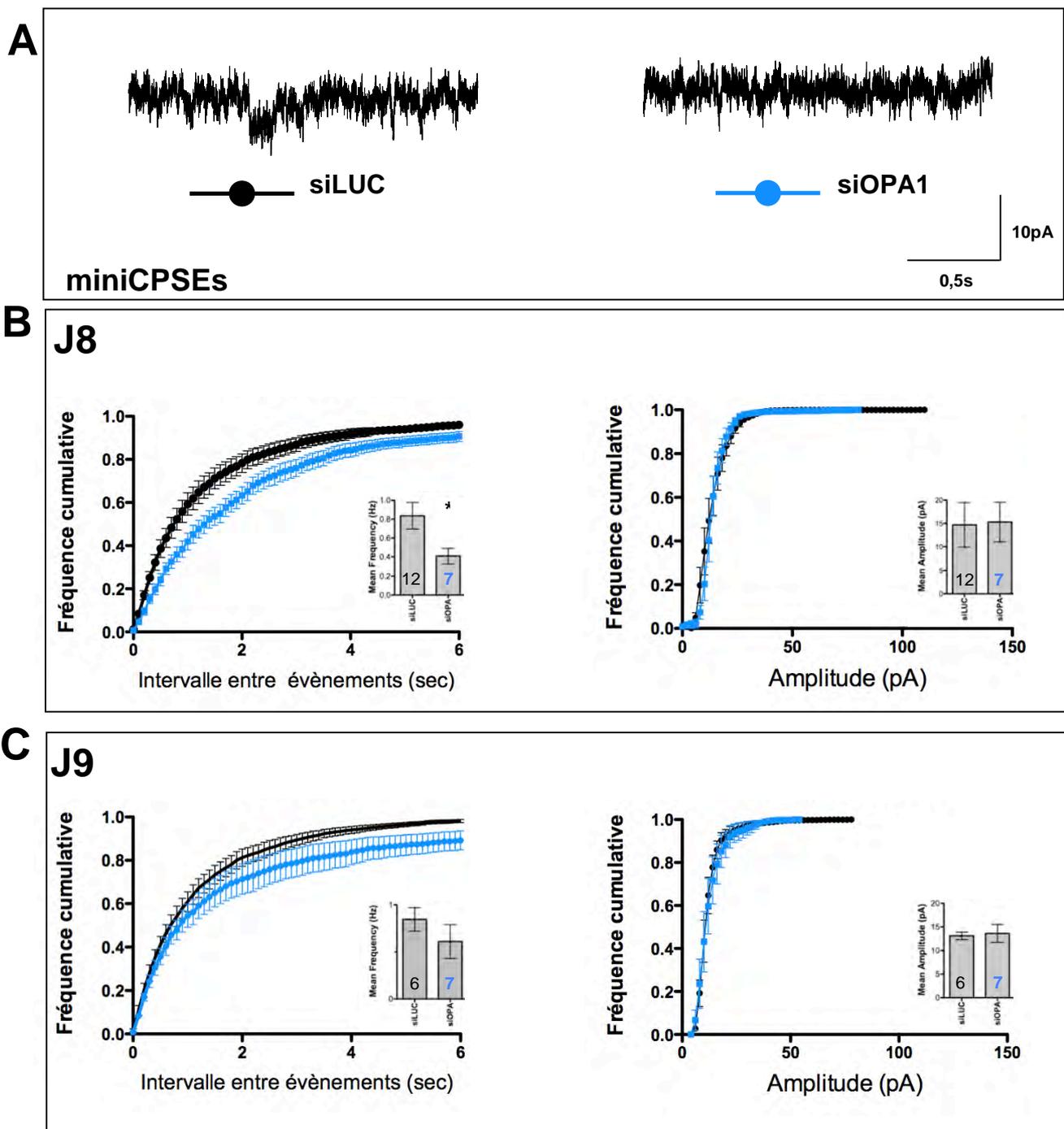
La fréquence des courants AMPA à J8 dans les neurones dépourvus d'OPA1 est également diminuée sans perturbation de leur amplitude (Fig.22B). En effet, la courbe bleue représentant la distribution des fréquences cumulées des intervalles entre deux événements, se décale dans le cas des neurones traités par le siOPA1 vers la droite et vers le bas par rapport à la courbe noire contrôle. De plus, la fréquence moyenne des courants est réduite significativement d'un facteur 2 dans les conditions siOPA1 par rapport au contrôle. À nouveau, aucun effet n'est observé sur l'amplitude des courants ni au travers de la fréquence cumulée, ni sur le critère de la moyenne.

Les résultats obtenus à J9 vont dans le même sens, mais, comme précédemment, une variabilité importante entre les cellules empêche de conclure définitivement (Fig.22C).

*La perte d'OPA1 provoque donc une réduction de la fréquence des événements miniatures NMDA et AMPA à J8, et probablement à J9, sans en modifier l'amplitude.*

#### IV-2-2- Etude des courants excitateurs spontanés (spCPSE)

Les courants spontanés excitateurs ont été enregistrés aux jours 8, 9 et 10 de culture. Leur analyse en terme d'amplitude est délicate, ceux-ci n'étant pas clairement



**Figure 22: Influence de l'extinction d'OPA1 sur les courants miniatures AMPA.**

Après transfection des siARN dirigés contre OPA1 ou contrôles à J5, les enregistrements ont été faits à J8 et J9.

**A:** Exemple de tracés de courants miniatures AMPA dans les conditions contrôle (noir) et siOPA1 (bleu)..

**B et C:** Les graphes représentent la distribution cumulative des fréquences (+/- SEM) des intervalles entre événements (graphe de gauche) et des valeurs d'amplitude (graphe de droite) pour les conditions de traitement par siOPA1 (bleu) et contrôle (noir), à J8 (B) et à J9 (C).

Un histogramme des moyennes (+/- SEM) est associé à chaque distribution.

\* :  $P < 0,05$  (Test de Student non Paired).

individualisés et apparaissant pour la plupart en bouffées (« bursts »). Le critère de la fréquence demeure accessible au logiciel.

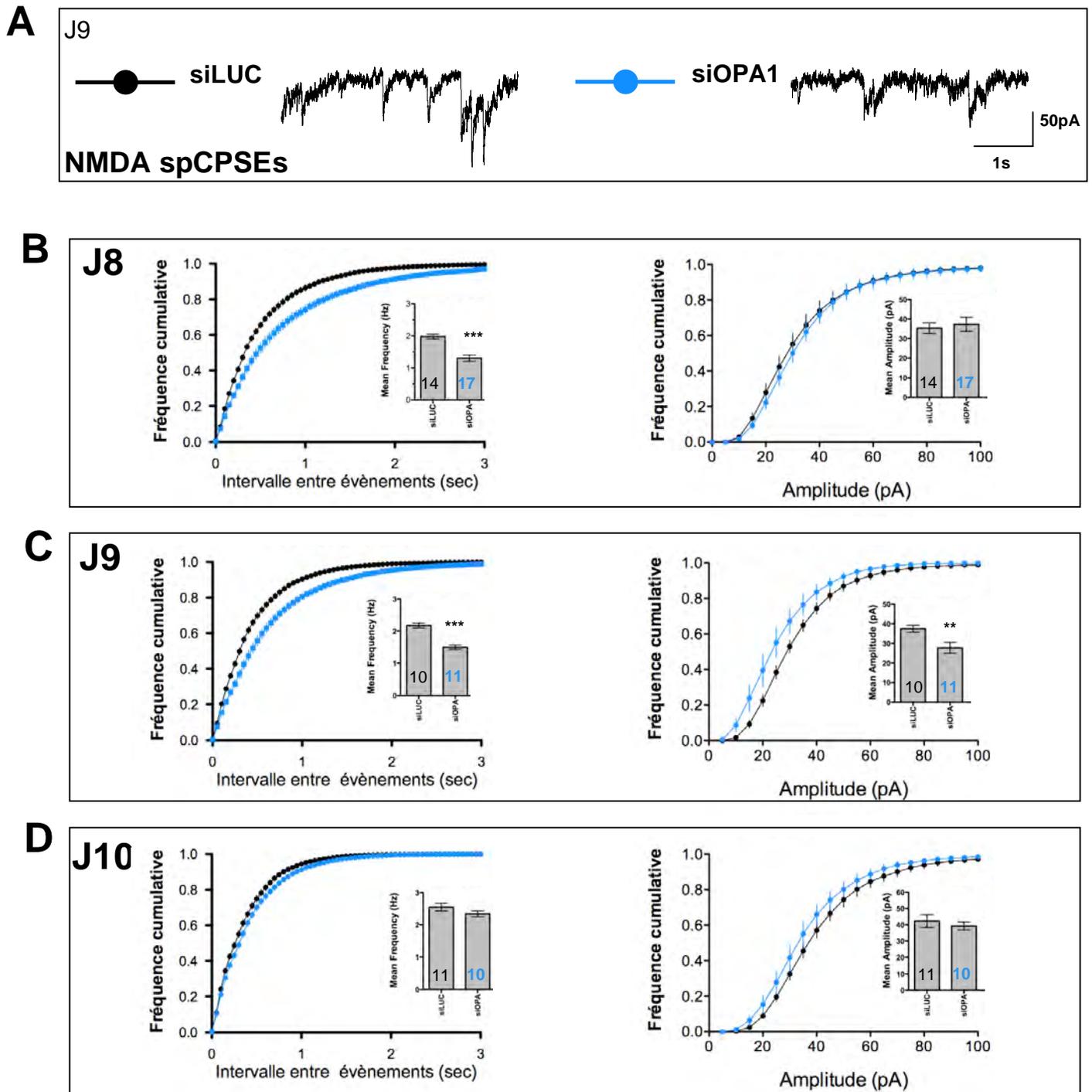
*-Courants NMDA (Fig. 23) :*

À J8, la courbe de la distribution des fréquences cumulées de l'intervalle de temps entre les spCPSE NMDA dans le cas des neurones transfectés par le siOPA1 (courbe bleue) est décalée vers la droite et vers le bas par rapport aux neurones traités par le siLUC (courbe noire) (Fig.23B). Ce déplacement traduit une diminution de la fréquence des événements NMDA, qui est également illustrée par une réduction significative de 35% de leur valeur moyenne. L'amplitude des courants (fréquence cumulée et moyenne) est par contre identique quelles que soient les conditions.

À J9, on observe de nouveau un décalage entre les distributions des fréquences cumulées de l'intervalle de temps entre les événements NMDA (Fig.23C). De même, la moyenne des fréquences est diminuée significativement de 31% dans le cas des neurones dépourvus d'OPA1. En ce qui concerne l'amplitude, la distribution des fréquences cumulées est légèrement décalée vers la gauche et vers le haut dans les neurones traités par le siOPA1 par rapport aux neurones contrôles et leur valeur moyenne est, elle, réduite significativement de 26% par l'interférence siOPA1. Ceci traduit une diminution de l'amplitude des courants NMDA dans les neurones traités par le siOPA1 par rapport aux neurones traités par le siLUC.

À J10, la fréquence et l'amplitude des événements NMDA des neurones transfectés par le siOPA1 sont comparables à celles des contrôles, alors que le taux de la protéine OPA1 est toujours diminué (Fig.23D). En effet, la protéine OPA1 n'est pas détectée par immunofluorescence dans les neurones ayant au moins 5 billes sur leur soma. Les effets de la perte d'OPA1 sur les courants excitateurs NMDA spontanés sont donc transitoires.

Parallèlement, pour tester un éventuel effet général de la transfection dans les neurones dépourvus de billes, i.e. les 90-95 % de neurones de la boîte de culture, nous avons comparé les réponses de ces neurones dans les conditions de transfection siOPA1 et siLUC. La figure 24 montre qu'il n'y a aucune différence entre les distributions cumulées des fréquences entre ces deux conditions à J8. Nos résultats préliminaires à J9 et J10 indiquent la même absence d'effet du milieu de transfection. Ces expériences contrôles, qui devront être étendues à l'enregistrement des courants miniatures, permettent de penser que l'effet observé est bien spécifique aux neurones dans lesquels l'expression d'OPA1 a été inhibée.



**Figure 23: Influence de l'extinction d'OPA1 sur les courants spontanés NMDA.**

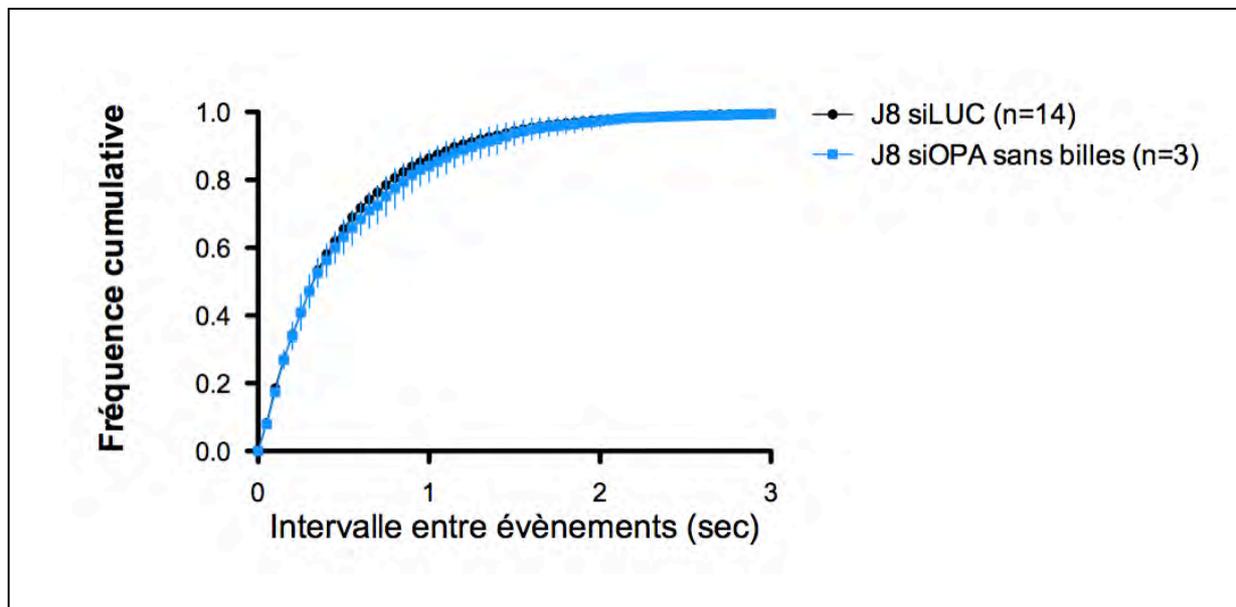
Après transfection des siARN dirigés contre OPA1 ou contrôles à J5, les enregistrements ont été faits à J8, J9 et J10.

**A:** Exemple de tracés de courants NMDA (Courants Post-Synaptiques Excitateurs spontanés NMDA) dans les conditions contrôle siLUC (noir) et siOPA1 (bleu).

**B, C et D:** Les graphes représentent la distribution cumulative des fréquences des intervalles entre évènements (+/- SEM) (graphe de gauche) et des valeurs d'amplitude (+/- SEM) (graphe de droite) pour les conditions de traitement par siOPA1 (bleu) et contrôle (noir), à J8 (B), J9 (C) et J10 (D).

Un histogramme des moyennes (+/- SEM) des évènements est associé à chaque distribution.

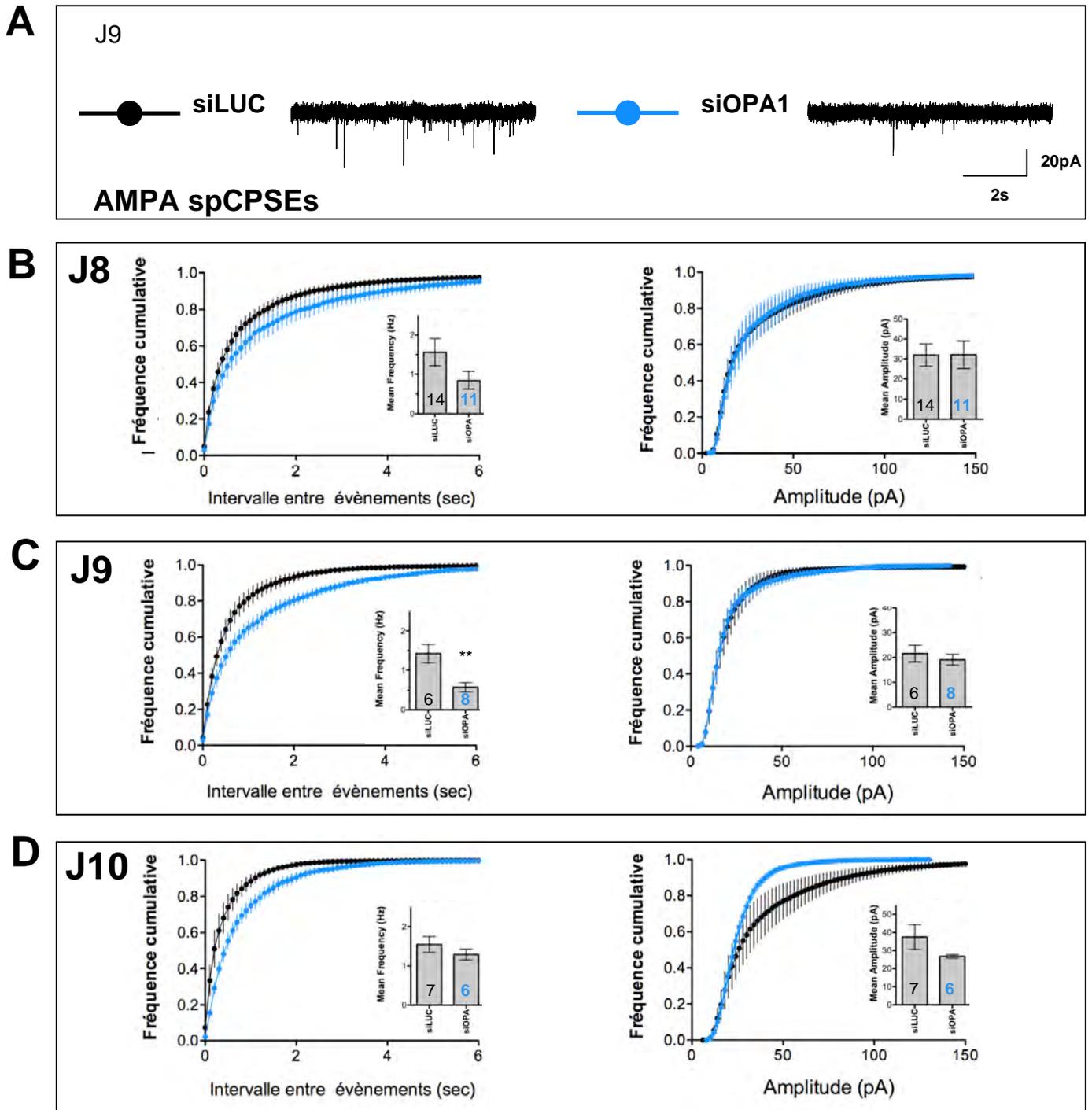
\*\*\* :  $P < 0,001$  (Test de Student non Paired).



**Figure 24: Influence de la transfection sur la distribution cumulée des fréquences des courants spontanés NMDA dans les neurones sans traceur CD4 .**

Après transfection des siARN dirigés contre OPA1 ou contrôles à J5, les enregistrements ont été faits à J8 dans des neurones dépourvus de billes, c'est-à-dire faisant partie des 90-95% de neurones ayant été soumis au milieu de transfection siOPA1 ou siLUC mais dans lesquels l'expression d'OPA1 est normale.

Les graphes représentent la distribution cumulative des fréquences des intervalles entre événements (+/- SEM) pour les conditions de traitement par siOPA1 (bleu) et contrôle (noir), à J8



**Figure 25: Influence de l'extinction d'OPA1 sur les courants spontanés AMPA.**

Après transfection des siARN dirigés contre OPA1 ou contrôles à J5, les enregistrements ont été faits à J8, J9 et J10.

**A:** Exemple de tracé de courant AMPA (Courants Post-Synaptiques Excitateurs spontanés AMPA) dans les conditions contrôle siLUC (noir) et siOPA1 (bleu).

**B,C et D:** Les graphes représentent la distribution cumulative des fréquences des intervalles entre évènements (+/- SEM) (graphe de gauche) et des valeurs d'amplitude (+/- SEM) (graphe de droite) pour les conditions de traitement par siOPA1 (bleu) et contrôle (noir), à J8 (B), J9 (C) et J10 (D).

Un histogramme des moyennes (+/- SEM) des évènements est associé à chaque distribution.

\*\* :  $P < 0,01$  (Test de Student non Paired).

-Courants AMPA (Fig. 25) :

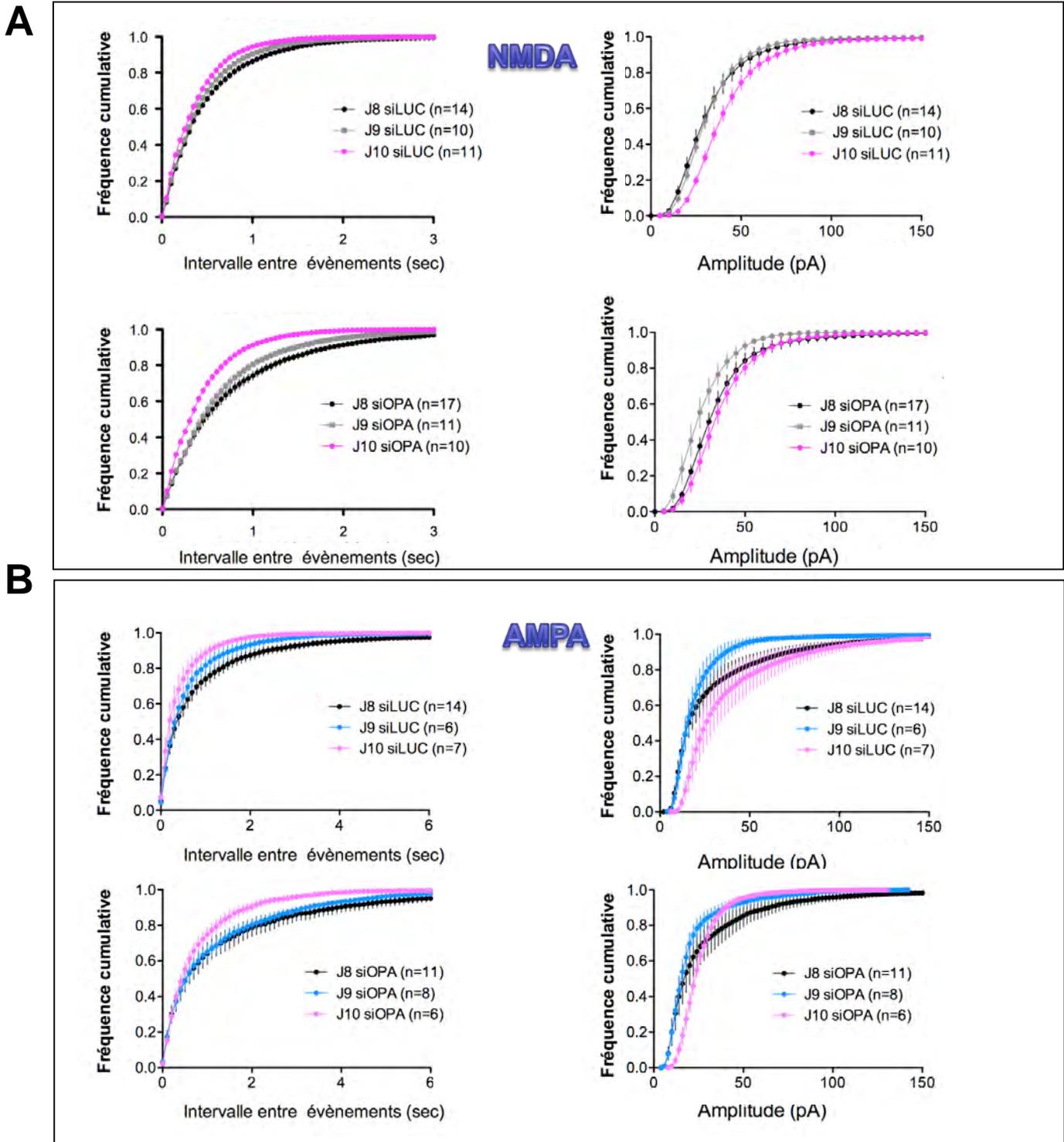
À J8, la fréquence des événements AMPA tend à diminuer dans les conditions d'interférence OPA1 mais de manière non significative (Fig.25B). L'amplitude des événements AMPA dans ces conditions est identique à celle des contrôles.

À J9, la fréquence des courants AMPA diminue fortement, comme en témoigne le décalage des courbes de distribution de la fréquence cumulée de l'intervalle de temps, ainsi que la baisse significative de 60% de la fréquence moyenne, dans les conditions siOPA1 par rapport aux contrôles siLUC (Fig.25C). Aucun effet sur l'amplitude n'est à noter.

À J10, la courbe de la distribution des fréquences cumulées de l'intervalle de temps entre deux événements en l'absence d'OPA1 est de nouveau déplacée vers la droite et vers le bas, alors que la fréquence moyenne diminue peu et de manière non significative (Fig.25D). Ceci indique que l'effet de la perte d'OPA1 sur la fréquence des courants excitateurs AMPA diminue au cours du temps. Concernant l'amplitude, la courbe représentant la distribution des fréquences cumulées dans les conditions siOPA1, est décalée vers la gauche et vers le haut. La moyenne des amplitudes tend à diminuer mais le seuil de significativité statistique n'est pas atteint. La perte d'OPA1 provoque donc une diminution de la fréquence des événements AMPA et semble aussi affecter leur amplitude.

La figure 26 illustre la comparaison entre les courbes obtenues à chaque stade, fréquences cumulées des intervalles entre événements (IEI) et amplitude, dans les conditions contrôles. Cette comparaison permet d'apprécier l'évolution des courants au cours de la maturation des neurones et démontre que la fréquence et l'amplitude des courants NMDA et AMPA augmentent entre J8 et J10. De nouveau, quelle que soit la difficulté d'interprétation concernant les variations d'amplitude, on constate une augmentation nette de la fréquence des courants synaptiques glutamatergiques entre les jours 8 et 10 en culture qui pourrait être imputée à la maturation fonctionnelle des neurones qui se déroule entre ces stades.

*L'extinction d'OPA1 diminue de manière notable et transitoire la fréquence des événements spontanés excitateurs NMDA au cours de la maturation électrique. Cet effet se produit vers le 8<sup>ème</sup> jour de culture, mais n'apparaît plus après 10 jours. Une diminution de la fréquence des événements spontanés excitateurs AMPA, suite à l'extinction d'OPA1, est également observée. En revanche, cet effet apparaît plus tardivement, au 9<sup>ème</sup> jour, et persiste au 10<sup>ème</sup> et au 11<sup>ème</sup> jours de culture (résultats préliminaires). Cette altération de la fréquence des courants traduit une perturbation au niveau de l'élément pré-synaptique et/ou au niveau du nombre de synapses. Il est intéressant de constater que ces effets interviennent de façon décalée pendant la maturation : les modulations des fréquences des*



**Figure 26: Influence de l'extinction d'OPA1 sur les courants spontanés excitateurs au cours du temps.**

Les fréquences et les amplitudes tendent à augmenter au cours de la maturation neuronale.

**A:** Les graphes représentent la distribution cumulative des fréquences des intervalles entre événements (+/- SEM) (graphe de gauche) et des valeurs d'amplitude des courants NMDA (+/- SEM) (graphe de droite) pour les conditions de traitement par siLUC (haut) et siOPA1 (bas) à J8 (Noir), J9 (Gris) et J10 (Rose).

**B:** Les graphes représentent la distribution cumulative des fréquences des intervalles entre événements (+/- SEM) (graphe de gauche) et des valeurs d'amplitude des courants AMPA (+/- SEM) (graphe de droite) pour les conditions de traitement par siLUC (haut) et siOPA1 (bas) à J8 (Noir), J9 (Bleu) et J10 (Rose).

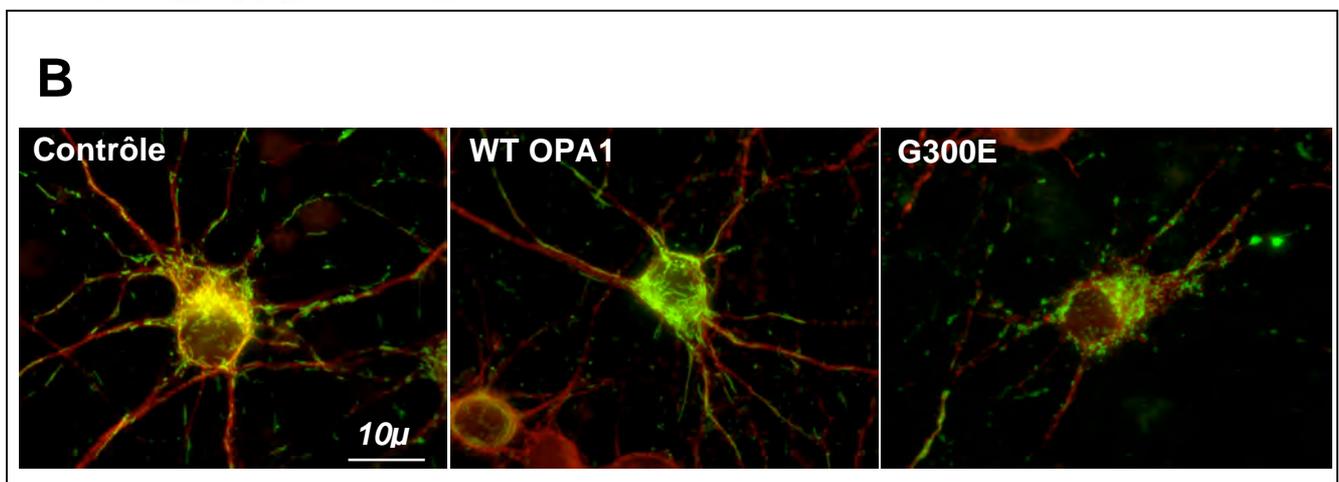
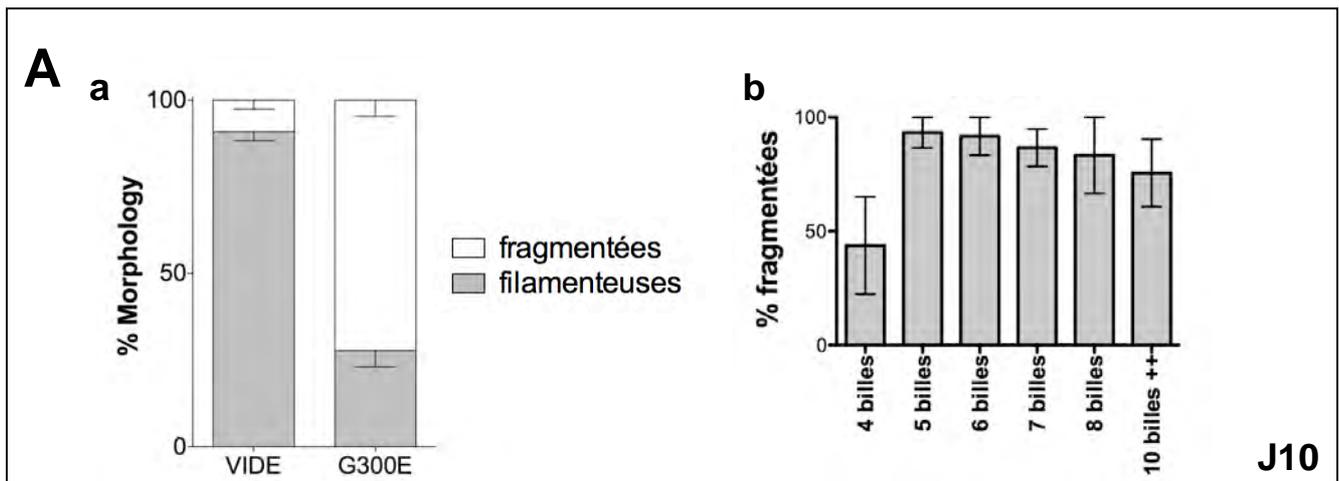
*courants NMDA précèdent d'un jour celles des courants AMPA. De même, l'amplitude des évènements spontanés excitateurs NMDA semble être perturbée légèrement de manière transitoire à J9 alors que l'amplitude des courants AMPA n'est réduite qu'à J10.*

*Néanmoins, un rappel s'impose ici pour permettre l'interprétation des effets sur l'amplitude des courants glutamatergiques. En effet, dans nos conditions, les courants spontanés ont tendance à se sommer (évènements en escalier) rendant ainsi difficile la mesure de l'amplitude d'un évènement seul. Le logiciel AxoGraph identifie chacun des évènements, et donc détermine la fréquence, mais la détermination de l'amplitude est sujette à caution. Les analyses des courants miniatures sont plus à même de montrer un éventuel effet sur l'amplitude puisque les courants, dans ces conditions, sont bien individualisés. Or, nos analyses ne montrent pas d'effet de l'extinction d'OPA1 sur l'amplitude des courants miniatures, NMDA ou AMPA, ce qui remet en question la réalité de l'effet observé sur l'amplitude des courants spontanés. En revanche, les fréquences des deux types de courants sont toutes deux diminuées, ce qui renforce la validité de nos observations que l'analyse supplémentaire de la variation du nombre d'évènements viendra compléter. Nous pouvons d'ores et déjà proposer que l'extinction d'OPA1 affecte la transmission glutamatergique en provoquant une diminution de la fréquence des courants synaptiques.*

#### IV-2-3- Etude de l'influence de l'expression d'un mutant dominant négatif (G300E) d'OPA1 sur la transmission synaptique excitatrice

Afin de compléter les résultats que nous avons obtenus en situation d'extinction d'OPA1, rappelant l'haploinsuffisance induite probablement par la majorité des mutations, nous avons étudié l'effet de la surexpression d'un mutant dominant négatif de la protéine, modèle alternatif de l'effet des mutations d'OPA1. En effet, il a été proposé que certaines des mutations d'OPA1 en particulier localisées dans le domaine GTPase, agirait selon un mécanisme de dominance négativité (Amati-Bonneau et al., 2009; Olichon et al., 2007). Nous avons utilisé la mutation faux sens G300E (une glycine remplacée par un acide glutamique en position 300) caractérisée au sein de notre laboratoire (Delettre et al., 2000; Olichon et al., 2007).

Pour cela, nous avons transfecté les cellules corticales au cinquième jour de culture par un vecteur permettant d'exprimer la protéine OPA1 mutée (OPA1G300E) ou par deux vecteurs contrôles : le premier permettant d'exprimer la protéine OPA1 sauvage (WT-OPA1), le second ne portant pas d'insert (vecteur vide). Dans les trois cas, le traceur CD4 a été co-transfecté dans un rapport un pour cinq afin de repérer les neurones transfectés par immuno-marquage grâce aux anticorps anti-CD4, couplés à des billes de polystyrène, déjà décrits. Nous avons dans un premier temps, analysé l'effet de l'expression du mutant G300E



**Figure 27: Influence de l'inhibition d'OPA1 par le dominant négatif G300E sur la morphologie des mitochondries**

**A:** Après co-transfection des plasmides codant pour la protéine G300E, ou le vecteur vide, et le plasmide codant pour la protéine-traceur CD4 à J5, les immuno-détections ont été faites à J10, avec un mélange d'anticorps OXPHOS dirigés contre différentes sous-unités de la chaîne respiratoire.

Les mitochondries ont été visualisées par microscopie de fluorescence et les comptages effectués sous microscope à l'objectif x100.

(a) Pourcentages respectifs (+/- SEM) des neurones présentant un réseau mitochondrial fragmenté (blanc) ou filamenteux (gris) (n=5).

(b) Evolution du pourcentage (+/- SEM) de neurones dont les mitochondries sont fragmentées, après transfection de G300E, en fonction du nombre de billes attestant de la présence du traceur CD4 (140 neurones).

**B:** Effet sur la morphologie mitochondriale (MisDendra, vert) de la surexpression de la protéine OPA1 sauvage et du mutant G300E par transduction lentivirale à J5 dans des neurones primaires de rat, par comparaison au lentivirus contrôle contenant la seule protéine mitochondriale fluorescente « MisDendra ». Les neurones sont détectés à J10 par l'immunoréactivité de la protéine Map2 (rouge).

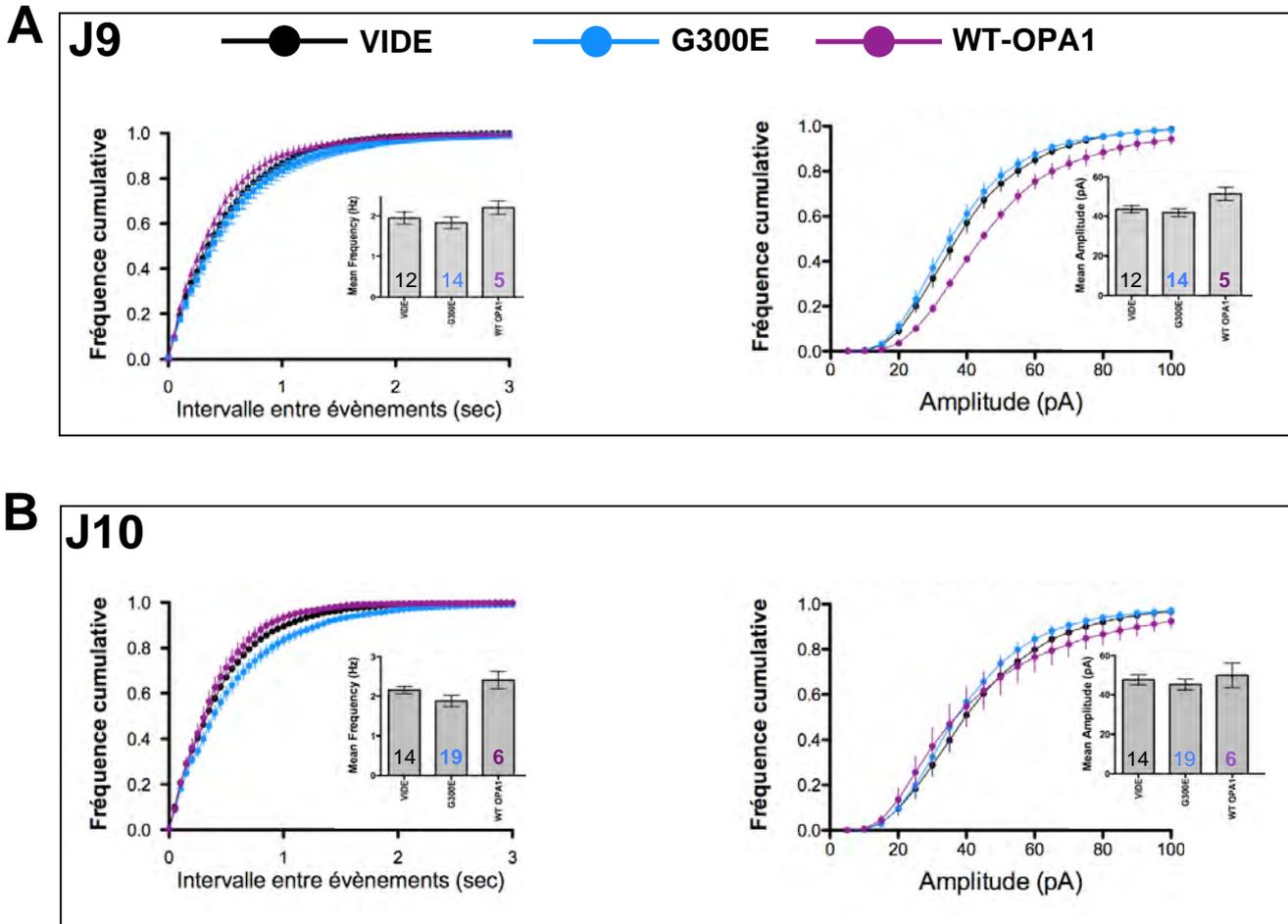
sur la morphologie des mitochondries. Pour ce faire, nous avons réalisé un immunomarquage à l'aide de l'anticorps OXPHOS sur cellules fixées 4 et 5 jours après transfection (soit au jour 9 ou 10 de culture). Dans les neurones transfectés par le vecteur vide, les mitochondries apparaissent filamenteuses. Après 5 jours, la surexpression du mutant G300E provoque, comme dans les neurones de rat et les cellules HeLa, la fragmentation des mitochondries (Fig.27Aa). La morphologie des mitochondries dans les neurones surexprimant la protéine OPA1 sauvage est en cours d'analyse. Néanmoins, la surexpression d'OPA1 sauvage dans des neurones embryonnaires de rat en culture primaire transduits par des constructions lentivirales (voir plus loin), n'entraîne pas de changement statistiquement significatif de la morphologie des mitochondries, contrairement au mutant OPA1G300E (Fig 27B).

Afin de sélectionner les neurones à enregistrer, nous avons ensuite déterminé la corrélation entre le nombre de billes fixées sur le soma et l'état de fragmentation du réseau mitochondrial. Près de 75% des neurones transfectés par le vecteur OPA1G300E possédant au moins 5 billes, ont un réseau mitochondrial fragmenté (Fig.27Ab). Nous avons donc réalisé les enregistrements électrophysiologiques sur les neurones dont le soma contient au moins 5 billes. Les enregistrements des courants spontanés excitateurs NMDA et AMPA ont été réalisés à J9 et J10, soit respectivement 4 et 5 jours après transfection, pour des neurones transfectés par le vecteur vide (courbe noire), le vecteur OPA1G300E (courbe bleue) et le vecteur WT-OPA1 (courbe violette).

*-Courants NMDA (Fig. 28) :*

À J9, les distributions des fréquences cumulées des intervalles entre les événements NMDA sont toutes superposées et les fréquences moyennes sont identiques (Fig.28A). Ceci révèle que l'expression du mutant G300E, comme celle de la protéine sauvage, n'affecte pas la fréquence des courants NMDA. Cette absence d'effet peut être corrélée à l'absence d'effet sur la morphologie des mitochondries. Cependant, dans le cas des neurones surexprimant OPA1 sauvage (WT-OPA1), la courbe représentant les fréquences cumulées des amplitudes des courants NMDA est décalée vers la droite et vers le bas par rapport à la courbe des neurones transfectés par le vecteur vide. De plus, l'amplitude des courants NMDA est en moyenne plus importante de 19% après surexpression de la protéine OPA1 sauvage. La surexpression de la protéine OPA1 sauvage semble donc augmenter l'amplitude des courants NMDA. En revanche, la surexpression du mutant G300E n'a aucun effet sur l'amplitude des courants NMDA.

À J10, la surexpression de la protéine G300E provoque un déplacement de la courbe de distribution des fréquences cumulées de l'intervalle entre deux événements NMDA vers la droite et vers le bas par rapport à la courbe contrôle vecteur vide (Fig.28B). La surexpression



**Figure 28: Influence de l'inhibition d'OPA1 par le dominant négatif G300E sur les courants spontanés NMDA.**

Après co-transfection des plasmides codant pour la protéine G300E, le vecteur vide ou la protéine OPA1 sauvage, et le plasmide codant pour la protéine-traceur CD4 à J5, les enregistrements ont été faits à J9 et J10.

**A et B:** Les graphes représentent la distribution cumulative des fréquences (+/- SEM) des intervalles entre événements (graphe de gauche) et des valeurs d'amplitude (+/- SEM) (graphe de droite) pour les conditions de traitement par la protéine G300E (bleu), le vecteur vide (noir) ou la protéine OPA1 sauvage (violet), à J8 (A) et J9 (B). Un histogramme des moyennes (+/- SEM) des événements est associé à chaque distribution.

d'OPA1G300E réduit donc la fréquence d'apparition des courants NMDA à un moment où son effet sur la morphologie des mitochondries est observable. La moyenne des fréquences baisse légèrement mais pas de manière statistiquement significative. La surexpression de la protéine OPA1WT n'a aucun effet sur la fréquence et l'amplitude des courants NMDA.

-Courants AMPA (Fig. 29) :

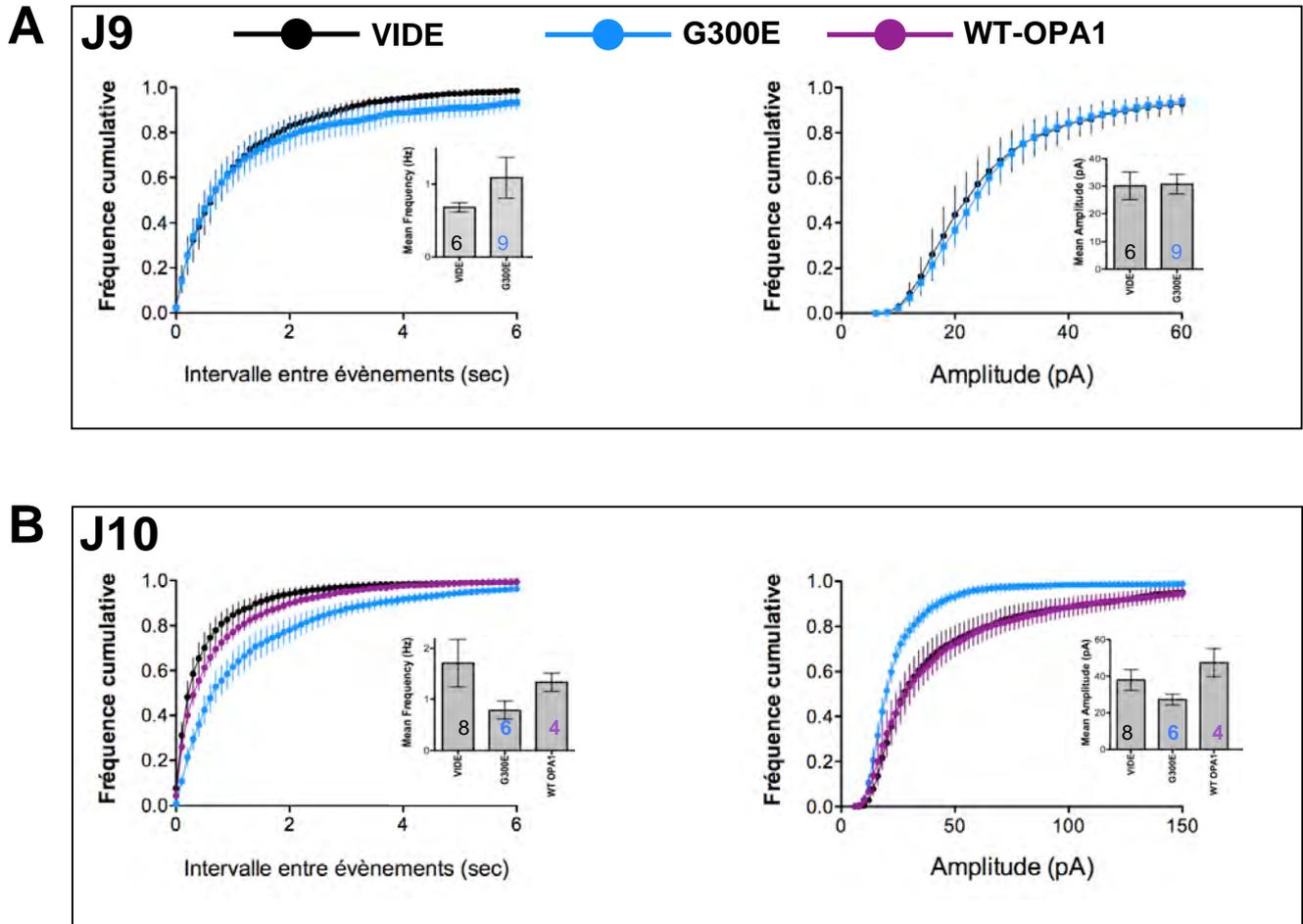
À J9, la surexpression de la protéine G300E n'entraîne aucune diminution de la fréquence, ni de l'amplitude des courants AMPA (Fig.29A). Les courants AMPA des neurones transfectés par WT-OPA1, n'ont pas été représentés du fait du petit nombre d'enregistrements réalisés.

À J10, nous observons un décalage vers la droite et vers le bas de la courbe de distribution des fréquences cumulées de l'intervalle entre deux événements AMPA dans les conditions G300E comparé à la condition contrôle vecteur vide (Fig.29B). La moyenne des fréquences est également réduite mais pas de manière statistiquement significative. Nous observons également une diminution de l'amplitude des événements AMPA traduite par un décalage vers le haut et la gauche de la distribution des fréquences cumulées des intervalles de temps entre les événements alors que l'amplitude moyenne ne varie pas significativement. La surexpression du mutant G300E diminue donc la fréquence et l'amplitude des courants AMPA.

*Ainsi, la surexpression du mutant G300E provoque une diminution des fréquences des courants spontanés NMDA, sans que leur amplitude soit modifiée, alors que les courants AMPA voient à la fois leur fréquence et leur amplitude diminuées. Cet effet n'est observé qu'après 5 jours de transfection, lorsque l'effet sur la morphologie mitochondriale est détectable, et donc probablement lorsque la protéine est en quantité suffisante pour exercer son effet dominant négatif sur la protéine endogène. Les résultats obtenus avec le mutant G300E sont très proches de ceux obtenus après 9 et 10 jours d'extinction de la protéine OPA1 dans le cas des courants NMDA et AMPA respectivement. La perte de fonction d'OPA1 a donc un impact sur la transmission synaptique excitatrice.*

#### IV-2-4- Restauration pharmacologique de la transmission glutamatergique

Un moyen de comprendre les effets de la perte d'OPA1 sur la transmission synaptique pourrait être d'identifier une molécule capable de contrecarrer cet effet. La perte d'OPA1 perturbe de manière plus importante la fréquence des courants que leur amplitude, ce qui pourrait refléter un problème au niveau pré-synaptique. Ce défaut, pourrait, étant donné l'effet de l'absence d'OPA1 sur les fonctions mitochondriales, être lié à un déficit



**Figure 29: Influence de l'inhibition d'OPA1 par le dominant négatif G300E sur les courants spontanés AMPA.**

Après co-transfection des plasmides codant pour la protéine G300E, le vecteur vide ou la protéine OPA1 sauvage, et le plasmide codant pour la protéine-traceur CD4 à J5, les enregistrements ont été faits à J9 et J10.

**A et B:** Les graphes représentent la distribution cumulative des fréquences (+/- SEM) des intervalles entre événements (graphe de gauche) et des valeurs d'amplitude (+/- SEM) (graphe de droite) pour les conditions de traitement par la protéine G300E (bleu), le vecteur vide (noir) ou la protéine OPA1 sauvage (violet), à J9 (A) et J10 (B).

Un histogramme des moyennes (+/- SEM) des événements est associé à chaque distribution.

énergétique. Nous avons donc cherché une molécule susceptible de pallier ce déficit, permettant de restaurer, sinon la dynamique mitochondriale, du moins l'énergétique mitochondriale et *in fine* de rétablir la transmission synaptique.

Un candidat susceptible de répondre à ces critères est la forskoline (FSK). Cette molécule est un activateur de l'adénylate cyclase, enzyme qui permet la conversion de l'ATP en AMPc. En outre, la FSK permet la potentialisation de la transmission synaptique notamment en renforçant au niveau de l'élément pré-synaptique, la libération de neurotransmetteurs de manière AMPc-dépendante (Chavis et al., 1998). De plus, une série d'articles a montré récemment une influence de la FSK et des voies qu'elle active, sur la morphologie mitochondriale en permettant l'élongation des mitochondries par inhibition de la fission (Dagda et al., 2011; Gomes et al., 2011; Schauss et al., 2010).

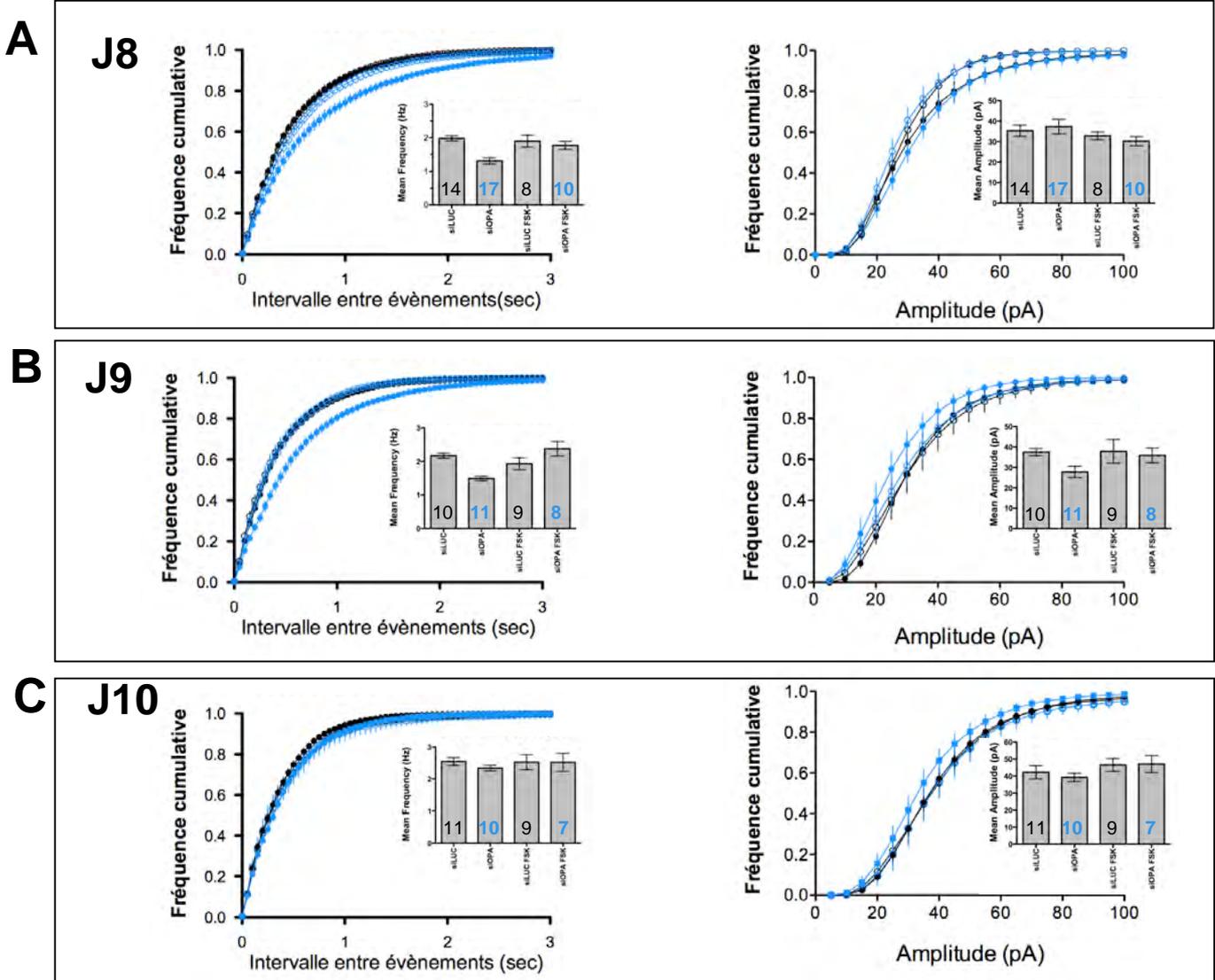
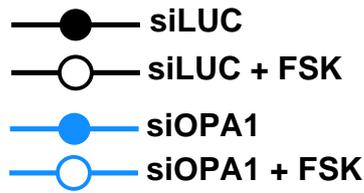
Pour tester l'effet d'un traitement à la FSK sur la transmission synaptique NMDA et AMPA en absence d'OPA1, nous avons traité les neurones par 10 $\mu$ M de FSK pendant 10 minutes avant de procéder aux enregistrements à J8, J9 et J10 dans les conditions préalablement décrites.

Les graphiques en figures 30 et 31 représentent la distribution des intervalles de temps entre deux évènements et des amplitudes des évènements dans les conditions contrôles siLUC (courbe noire, cercles pleins), les conditions d'extinction de la protéine OPA1 (courbe bleue, cercles pleins), les conditions contrôles traitées à la FSK (courbe noire, cercles vides) et les conditions siOPA1 traitées à la FSK (courbe bleue, cercles vides).

Les enregistrements des courants NMDA dans les conditions contrôles à J8, J9 et J10, montrent que le traitement par la FSK n'augmente ni la fréquence ni l'amplitude des courants spontanés NMDA (Fig.30). En effet, les courbes des fréquences cumulées en présence ou en absence de FSK se superposent et les fréquences moyennes sont identiques. Ceci suggère que l'activité synaptique NMDA des neurones est déjà maximale dans les conditions contrôles quel que soit le jour d'enregistrement.

À J8 et à J9, les neurones dépourvus d'OPA1, après traitement par la FSK, présentent une fréquence comparable à celle des contrôles siLUC, avec une augmentation significative de 26% (J8) et de 37% (J9) de la fréquence moyenne par rapport à celle observées dans les neurones en absence d'OPA1. L'amplitude des évènements spontanés NMDA est identique dans tous les cas (Fig.30 A, B).

À J10, en absence ou en présence de FSK, la fréquence et l'amplitude des évènements NMDA des neurones traités par le siOPA1 sont comparables à celles des contrôles (Fig.30C).

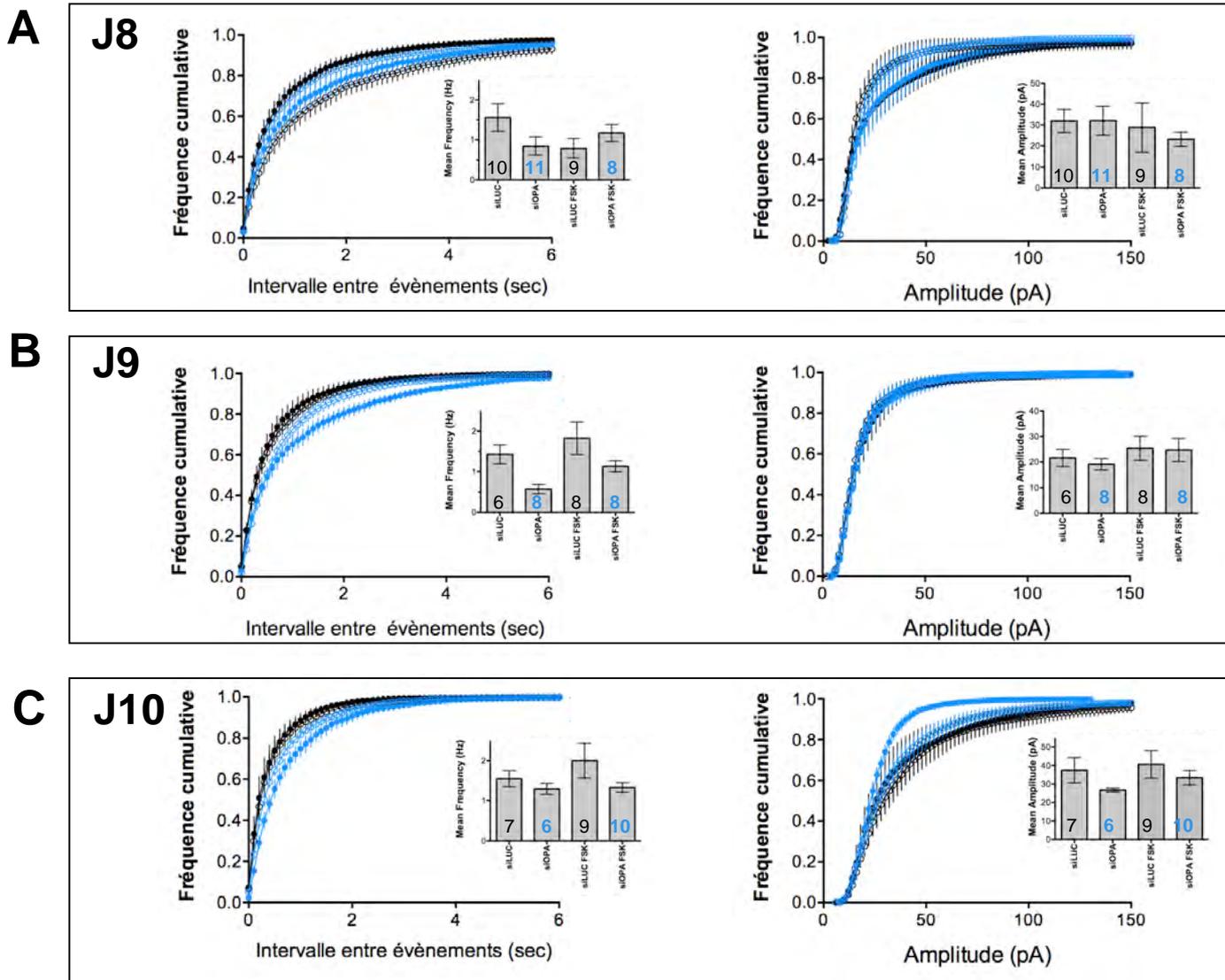
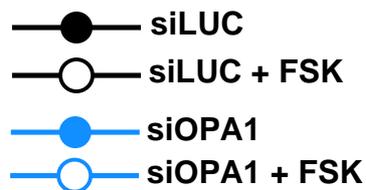


**Figure 30: Effet de la Forskoline après extinction d'OPA1 sur les courants spontanés NMDA**

Après transfection des siARN dirigés contre OPA1 ou contrôles à J5, un traitement à la Forskoline (10µM pendant 10 minutes) a été réalisé avant les enregistrements, effectués à J8, J9 ou J10.

**A,B et C:** Les graphes représentent la distribution cumulative des fréquences (+/- SEM) des intervalles entre événements (graphe de gauche) et des valeurs d'amplitude (+/- SEM) (graphe de droite) pour les conditions de traitement par siOPA1 sans ou avec FSK (bleu/bleu et bleu/blanc) et contrôle sans ou avec FSK (noir/noir et noir/blanc), à J8 (A), J9 (B) et J10 (C).

Un histogramme des moyennes (+/- SEM) des événements est associé à chaque distribution.

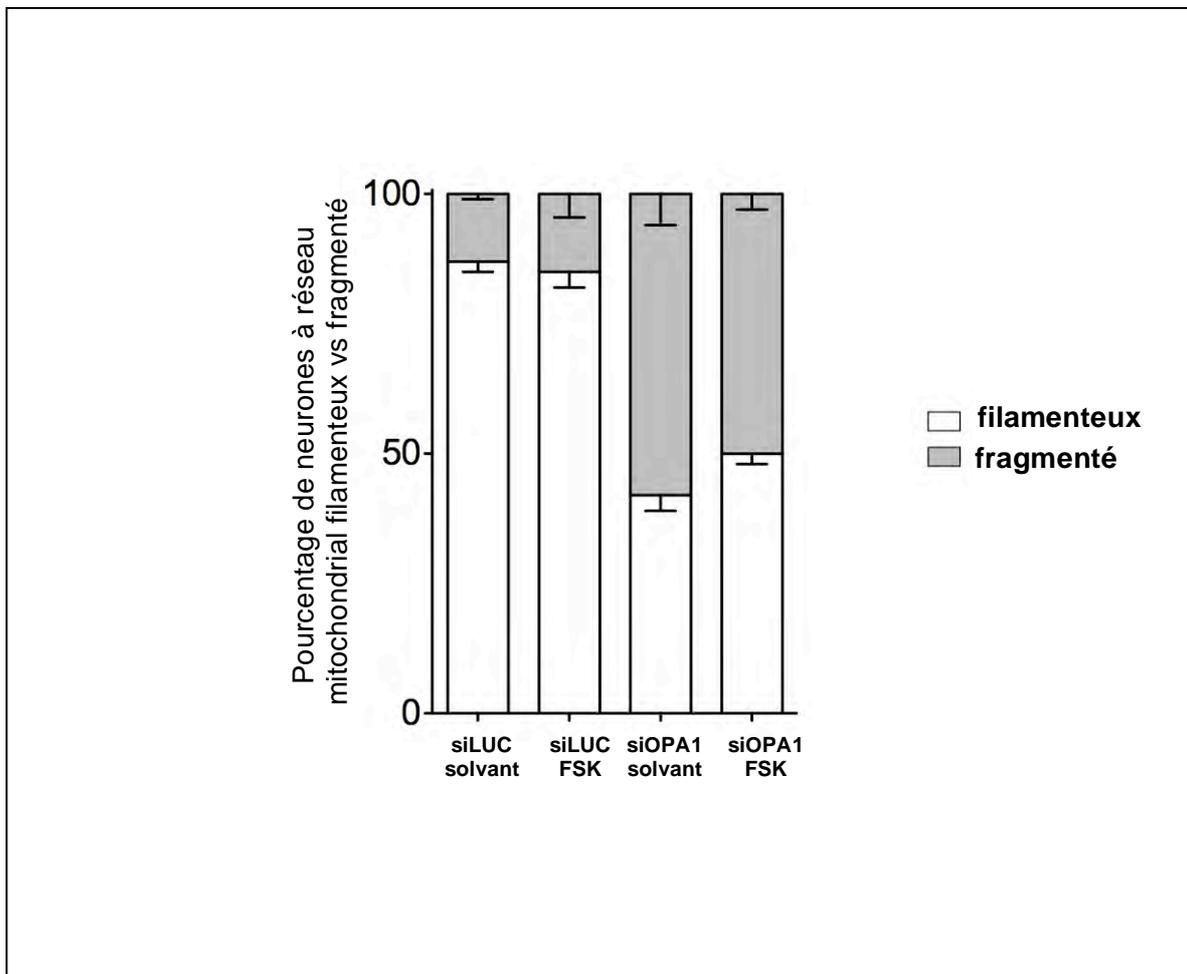


**Figure 31: Effet de la Forskoline après extinction d’OPA1 sur les courants spontanés AMPA.**

Après transfection des siARN dirigés contre OPA1 ou contrôles à J5, un traitement à la Forskoline (10µM pendant 10 minutes) a été réalisé avant les enregistrements, effectués à J8, J9 ou J10.

**A, B et C:** Les graphes représentent la distribution cumulative des fréquences (+/- SEM) des intervalles entre événements (graphe de gauche) et des valeurs d’amplitude (+/- SEM) (graphe de droite) pour les conditions de traitement par siOPA1 sans ou avec FSK (bleu/bleu et bleu/blanc) et contrôle sans ou avec FSK (noir/noir et noir/blanc), à J8 (A), J9 (B) et J10 (C).

Un histogramme des moyennes (+/- SEM) des événements est associé à chaque distribution.



**Figure 32: Effet d'un traitement Forskoline et de l'extinction d'OPA1 sur la morphologie mitochondriale**

Après transfection des siARN dirigés contre OPA1 ou contrôles siLUC à J0, un traitement à la Forskoline (FSK, 10 $\mu$ M pendant 10 minutes, ou véhicule EtOH) a été réalisé à J6, 1 heure avant l'immunodétection des mitochondries (OXPHOS). La morphologie du réseau a été analysée au microscope à fluorescence (x100) et représentée sous forme de pourcentages de neurones à réseau mitochondrial filamenteux (gris) vs fragmenté (blanc) (10 neurones/lamelles; 3 lamelles/condition; n=2).

À J8 et à J9, les fréquences des courants AMPA dans les neurones dépourvus d'OPA1 sont restaurées par un traitement à la FSK (Fig.31 A, B). En effet, la distribution des fréquences cumulées des intervalles entre deux évènements tend alors à se superposer à la courbe contrôle tandis que la fréquence moyenne des courants est augmentée de manière non significative à J8 et d'un facteur 2 à J9 par rapport aux conditions siOPA1 non traitées. L'effet de la FSK à J10 sur la fréquence n'est que partiel (Fig.31C). En revanche, le traitement à la FSK des contrôles tend à baisser la fréquence des évènements. Ceci pourrait être le fait d'une sur-activation qui provoquerait une diminution d'apparition des courants puisque la FSK est un moyen pharmacologique pour optimiser la transmission synaptique.

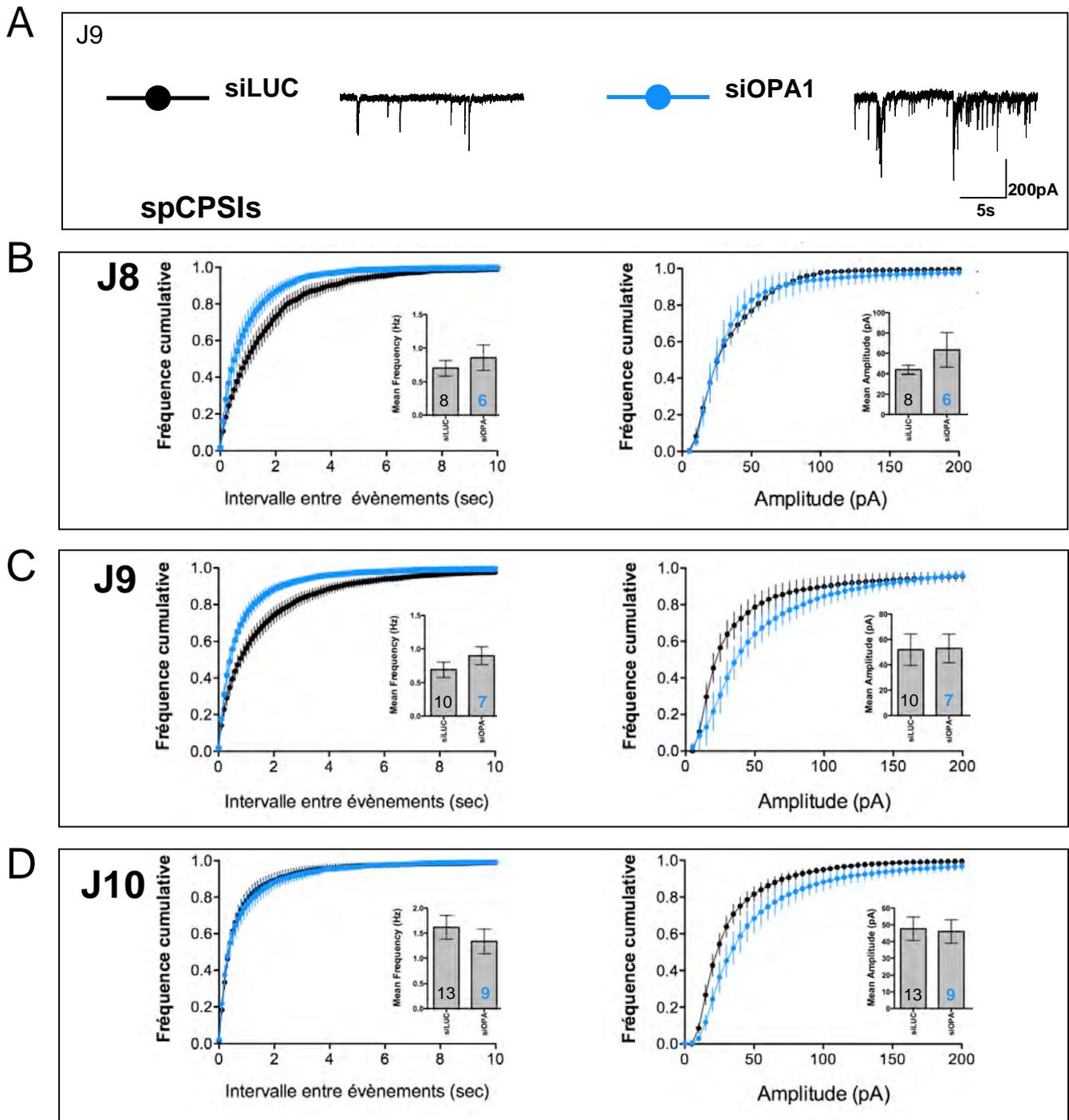
À J8 et J9, les amplitudes des courants AMPA des neurones traités par siOPA1 ou siLUC, avec ou sans FSK, sont identiques. Ce résultat n'est pas surprenant puisqu'à ce stade de culture, la perte d'OPA1 n'a pas d'effet sur l'amplitude. En revanche, à J10, la diminution de l'amplitude des courants AMPA induite par la perte d'OPA1 est supprimée comme en témoigne le rapprochement de la courbe des fréquences cumulées de l'amplitude vers la courbe contrôle. La moyenne des amplitudes est également augmentée mais de manière non significative (Fig.31).

Pour déterminer si l'action de la FSK passe par une restauration de la morphologie mitochondriale, nous avons examiné les mitochondries dans des neurones traitées par un siOPA1 ou un siLUC, et incubés ou non avec la FSK, par immunofluorescence indirecte avec l'anticorps OXPHOS (Fig.32). La présence de la FSK ne restaure pas une morphologie filamenteuse dans les neurones traités par le siOPA1 et est sans effet sur les neurones contrôles.

*La FSK permet donc de contrecarrer les perturbations de la transmission synaptique induite par la diminution d'expression d'OPA1, suggérant que ces dysfonctionnements peuvent être compensés par une activation de la voie adénylate cyclase. La FSK ne restaurant pas une morphologie mitochondriale normale dans les neurones dépourvus d'OPA1 dans ces conditions de traitement, elle pourrait exercer son effet en restaurant l'activité de la chaîne respiratoire.*

#### **IV-3- Etude de la transmission GABAergique**

Afin de compléter la caractérisation de l'effet de la perte d'OPA1 sur la transmission synaptique, nous avons débuté l'étude de la transmission GABAergique, la voie majoritaire d'inhibition du système nerveux central. La liaison du GABA, neurotransmetteur inhibiteur sur des canaux GABA-A ionotropiques permet une entrée d'ions chlorure au niveau du soma,



**Figure 33: Influence de l'extinction d'OPA1 sur les courants spontanés GABA.**

Après transfection des siARN dirigés contre OPA1 ou contrôles à J5, les enregistrements ont été faits à J8, J9 et J10.

**A:** Exemple de tracés de courants GABA (Courants Post-Synaptiques Inhibiteurs spontanés) dans les conditions contrôle siLUC (noir) et siOPA1 (bleu).

**B, C et D:** Les graphes représentent la distribution cumulative des fréquences (+/- SEM) des intervalles entre événements (graphe de gauche) et des valeurs d'amplitude (+/- SEM) (graphe de droite) pour les conditions de traitement par siOPA1 (bleu) et contrôle (noir), à J8 (B), J9 (C) et J10 (D).

Un histogramme des moyennes (+/- SEM) des événements est associé à chaque distribution.

\*\* :  $P < 0,01$  (Test de Student non Paired).

qui est à l'origine de courants post-synaptiques inhibiteurs (CPSI).

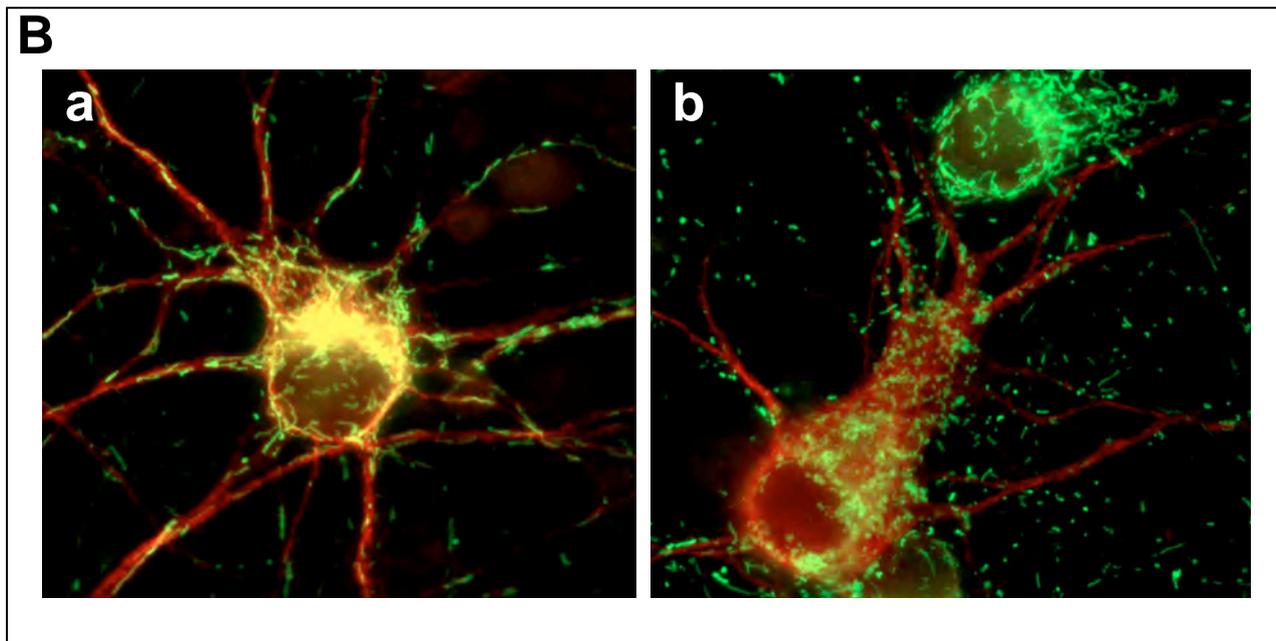
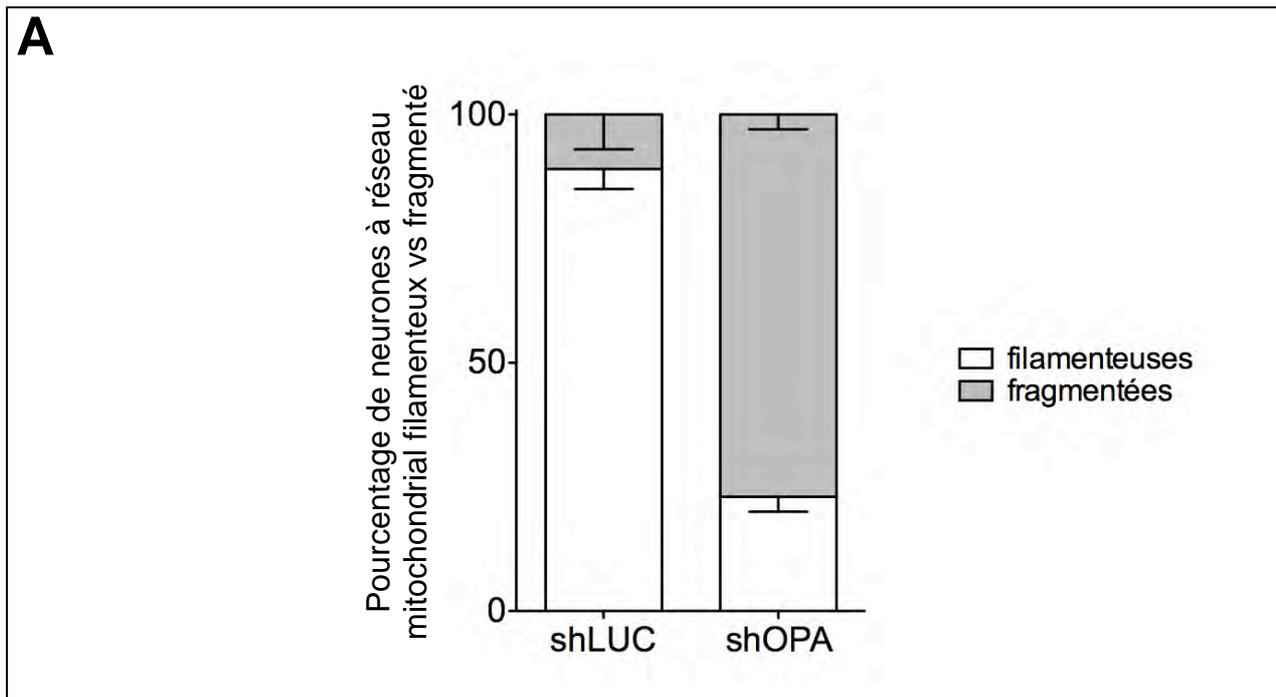
Nous avons procédé à la même démarche que pour les courants excitateurs en analysant des neurones transfectés par les siOPA1 ou les siLUC. Seuls les résultats sur les courants spontanés seront présentés, les données sur les courants miniatures étant incomplètes. Les courants excitateurs ont été inhibés grâce à la perfusion d'antagonistes des récepteurs du glutamate de type NMDA et AMPA, directement dans la chambre d'enregistrement (respectivement le CNQX et l'AP-5). Les enregistrements ont été effectués aux jours 8, 9 et 10 de culture. Les courants GABA se présentent en événements bien individualisés.

L'extinction d'OPA1 entraîne à J8 un décalage cette fois-ci vers la gauche de la courbe bleue de distribution des fréquences cumulées de l'intervalle de temps entre deux événements GABA par rapport à la courbe contrôle (noire) (Fig.33B). Ce déplacement vers les faibles valeurs traduit une augmentation de la fréquence d'apparition des courants GABAergiques. La fréquence moyenne d'apparition des courants inhibiteurs tend à augmenter dans les conditions de traitement par le siOPA1 mais pas de manière significative. La fréquence cumulée de l'amplitude des courants GABA est inchangée entre les deux conditions, et la moyenne des amplitudes n'est pas significativement modifiée.

Nous observons à J9, un écart plus prononcé entre les courbes siOPA1 et siLUC représentant les intervalles entre deux événements GABA, sans différence significative de la fréquence moyenne des courants (Fig.33C). La courbe bleue de la fréquence cumulée des amplitudes des courants GABA dans le cas des neurones transfectés par le siOPA1 est décalée vers la droite par rapport à la courbe contrôle noire. Ce décalage n'apparaît cependant pas significatif. Aucune différence n'est observée au niveau des amplitudes moyennes entre les deux conditions.

À J10, les deux courbes (bleue et noire) de distribution de la fréquence cumulée pour les intervalles entre les événements GABA se superposent. En ce qui concerne leur amplitude, les mêmes observations qu'à J9 peuvent être réalisées, le décalage n'étant pas significatif (Fig. 33D).

*La perte d'OPA1 augmente donc de manière transitoire la fréquence des courants GABAergiques sans altérer de manière significative leur amplitude.*



**Figure 34: Effet de lentivirus shOPA1 sur la morphologie des mitochondries.**

Des lentivirus shOPA1/MisDendra et shLUC/MisDendra ont été utilisés pour transduire les cellules primaires de souris à J5, fixation à J10.

**A** : Le pourcentage de neurones primaires de souris transduits ayant un réseau mitochondrial fragmenté (blanc) ou filamenteux (gris) a été compté sous microscope à l'objectif 100 (20 neurones/lamelles; 3 lamelles/ condition; n = 2).

**B** : Illustration de la morphologie des mitochondries, visualisées par microscopie à fluorescence grâce au marqueur fluorescent mitochondrial MitoDendra à 594nm, après transduction de cellules corticales de rat dans des conditions identiques. Les neurones sont visualisés par immunodétection de la protéine Map2.

#### **IV-4- Effet de la perte d'OPA1 sur la morphologie des neurones**

Les données électrophysiologiques indiquent que la perte d'OPA1 perturbe la transmission synaptique en agissant au niveau de l'élément pré-synaptique et/ou en modifiant le nombre de synapses. Afin de tester ces hypothèses, l'analyse par immunocytochimie des synapses glutamatergiques et GABAergiques est en cours.

Étant donné le faible rendement de la transfection chimique, il nous est difficile de mettre en évidence une éventuelle différence du nombre de synapses. En effet, il est délicat de distinguer les synapses qui appartiennent aux neurones possédant une quantité réduite de protéine OPA1 des neurones non affectés. Il aurait fallu pour cela co-transfecter un traceur GFP cytosolique qui aurait dessiné la morphologie du neurone ciblé et facilité la localisation des synapses cibles. Nous avons donc utilisé une autre stratégie alternative permettant de modifier une plus grande proportion (près de 80%) des neurones : la transduction virale. Pour cela, nous avons mené un partenariat avec l'entreprise Vectalys pour construire et produire des lentivirus permettant d'exprimer un ARN interférant ciblant la Luciférase (shLUC) et un ARN interférant ciblant OPA1 (shOPA1). Chaque lentivirus possède deux promoteurs indépendants : un promoteur pour le shARN et un promoteur permettant d'exprimer une protéine fluorescente adressée à la mitochondrie, la MisDendra. Cette construction permet ainsi de repérer les neurones transduits grâce à l'accumulation de la protéine fluorescente dans la mitochondrie. Cette protéine fluorescente photo-convertible émet dans le vert quand elle est excitée à 490 nm puis dans le rouge après excitation aux UV (Gurskaya et al., 2006). La transduction virale a été réalisée après trois jours de culture et les neurones ont été fixés à J8, J9 et J10. Nous avons en premier lieu déterminé l'efficacité maximale de transduction des neurones (au moins 80%) qui est obtenue à une multiplicité d'infection de 30 particules virales par cellule (MOI30) dès J8. Les mitochondries apparaissent fragmentées dans 20% des neurones transduits par le shOPA1 à J8 et dans 80% des neurones transduits à J10 (Fig.34A). La transduction par le shLUC est, elle, sans effet. La morphologie des mitochondries caractérisée par microscopie à fluorescence est illustrée ici après transduction de neurones de rat dans des conditions identiques (Fig.34B). Nous avons ensuite procédé aux co-immunomarquages des synapses glutamatergiques par le couple d'anticorps des compartiments pré- et post-synaptiques vGLUT1-PSD95 et des synapses GABAergiques par le couple GAD65-Gephyrine. L'analyse des images obtenues en microscopie à fluorescence est en cours.



## DISCUSSION

La dynamique mitochondriale doit jouer un rôle crucial au sein des neurones. En effet, alors qu'il s'agit d'un processus ubiquitaire, sa perturbation engendre majoritairement des atteintes neurologiques. Ce travail de thèse avait pour but, à travers l'étude des fonctions et des dysfonctions d'OPA1, de mieux comprendre l'influence de la dynamique mitochondriale sur les neurones à la fois en termes de maturation et en termes de fonctionnement. Pour cela, nous avons introduit au laboratoire un nouveau modèle cellulaire correspondant à des neurones corticaux de rats ou de souris en culture primaire, capables de progresser d'un état immature à un état mature *ex vivo* et doués d'activité électrique.

### ***La morphologie et le fonctionnement des mitochondries varient au cours de la maturation neuronale :***

Dans un premier temps, nous avons caractérisé la morphologie des mitochondries au cours de la maturation neuronale *ex vivo*.

Quel que soit le stade de maturation, les mitochondries sont globalement filamenteuses et colonisent tous les compartiments des neurones corticaux. Ce type de morphologie a déjà été mis en évidence dans différents types de neurones en culture et *in vivo* dans diverses structures cérébrales (Chang and Reynolds, 2006a; Li et al., 2004; Popov et al., 2005; Uo et al., 2009; Voccoli and Colombaioni, 2009). Ces travaux ont de plus mis en évidence l'existence de différences de morphologie et de distribution des mitochondries entre les différents compartiments neuronaux. Ainsi, dans des neurones corticaux de rat en culture primaire, les mitochondries sont plus nombreuses au niveau des dendrites et occupent une grande partie du volume neuritique (Li et al., 2004). Au contraire, dans les axones, les mitochondries sont plus courtes et montrent une distribution plus éparse (Li et al., 2004; Popov et al., 2005). Des différences ont également été constatées au sein d'un même compartiment. Les dendrites proximales sont plus riches en mitochondries par rapport aux dendrites distales et de petit diamètre (Li et al., 2004). De plus, les mitochondries sont rarement observées dans les épines dendritiques, même si elles se localisent toujours à proximité (Li et al., 2004). Nos observations qui se sont limitées dans un premier temps aux zones proximales des neurites, pourraient donc être par la suite élargies aux zones distales des dendrites et des axones notamment grâce à l'utilisation de chambres de culture microfluidiques. En effet, cette technologie permet de séparer et d'individualiser les axones de neuronesensemencés dans l'une des chambres, par une croissance axonale dans de fins canaux vers une seconde chambre qu'ils colonisent (Kilinc et al., 2011). Une



transduction virale des neurones par un lentivirus exprimant une GFP mitochondriale permettra d'étudier la distribution mais aussi la mobilité des mitochondries dans les axones.

Nous avons mis en évidence une hyperfilamentation transitoire des mitochondries cours de la maturation des neurones corticaux *ex vivo* : la taille moyenne des mitochondries augmente de 50% à J6, diminue dès le 8<sup>e</sup> jour et retrouve à J12 une valeur proche de celle de J2. Des changements de morphologie mitochondriale entre les neurones immatures et les neurones matures ont été précédemment décrits dans des neurones corticaux de rat en culture primaire (Chang and Reynolds, 2006a); avec une taille moyenne des mitochondries à J14 pour les neurones matures, augmentée de 20% par rapport aux mitochondries des neurones immatures à J5 (Chang and Reynolds, 2006a). En complément de cette étude, nos travaux ont permis d'observer pour la première fois, l'évolution morphologique des mitochondries tout au long de la maturation neuronale et de montrer qu'elles subissent un phénomène d'hyperfilamentation transitoire. Le fait que la taille des mitochondries diminue dans les neurones matures est particulièrement intéressant si l'on considère que des mitochondries de petites tailles sont plus facilement mobilisables que de longues mitochondries. Dans ce sens, il a été montré que l'inactivation de DRP1 dans les neurones perturbe la distribution des mitochondries dans les zones éloignées du soma (Li et al., 2004).

L'hyperfilamentation transitoire des mitochondries que nous avons observée dans les neurones en maturation à J6, est corrélée à l'existence de modifications d'expression de certains acteurs de la dynamique mitochondriale. Alors que deux formes de la protéine DRP1 sont présentes à J0, seule la forme longue s'accumule au cours du temps, tandis que l'isoforme courte disparaît dès J2. Ce profil protéique pourrait résulter d'un épissage alternatif de l'ARNm de DRP1. En effet, les neurones corticaux expriment plusieurs variants d'épissage de DRP1, notamment une isoforme spécifique des neurones qui possède l'exon 3 (Uo et al., 2009). Néanmoins, les fonctions respectives de chacune des isoformes de DRP1 restent inconnues. En revanche, les modifications post-traductionnelles de DRP1 qui pourraient faire varier la masse moléculaire apparente de DRP1 au cours de la migration électrophorétique sont, elles, mieux caractérisées. Cependant, ni la phosphorylation, ni la sumoylation, ni la nitrosylation de DRP1 ne changent la migration électrophorétique de la protéine (Chang and Blackstone, 2007b; Cho et al., 2009; Cribbs and Strack, 2007; Zunino et al., 2007).

Les deux mitofusines se comportent différemment lors de la maturation des neurones ; alors que la quantité de MFN2 reste inchangée, MFN1 disparaît à partir de J6. Parallèlement, la quantité de l'isoforme longue de la protéine OPA1(b) augmente progressivement de J2 à J12. L'augmentation de la forme longue d'OPA1, décrite comme étant la forme fusogène de la dynamine (Ishihara et al., 2006), même si les formes longues



et courtes sont toutes deux requises pour le processus de fusion (Song et al., 2007), pourrait expliquer l'augmentation de la filamentation des mitochondries au cours de la maturation des neurones. Étant donné que l'action fusogène d'OPA1 dépend de MFN1 (Cipolat et al., 2004), la diminution de l'expression de MFN1 à partir du 6<sup>e</sup> jour de culture, pourrait avec l'augmentation progressive de DRP1, expliquer la nature transitoire de cette hyperfilamentation. De plus, le rapport protéique de l'isoforme longue d'OPA1 sur MFN1 présente une augmentation transitoire. Ainsi, à J6 nous pouvons spéculer que les forces de fusions prédominent, renforçant le fait d'une hyperfilamentation mitochondriale. De façon intéressante, les changements d'expression de OPA1, DRP1 et MFN1 que nous avons mis en évidence lors de la maturation neuronale *ex vivo* sont également observés *in vivo* au cours du développement, soulignant l'intérêt de notre modèle.

Une augmentation de la filamentation mitochondriale précède la différenciation de nombreux types cellulaires. Ainsi, les mitochondries au départ fragmentées adoptent une morphologie filamenteuse au cours du processus de différenciation dans une lignée de neuroblastes immortalisés (Voccoli and Colombaioni, 2009), dans des myoblastes (De Palma et al., 2010) et des cellules souches embryonnaires (Wilkerson and Sankar, 2011). De plus, le nombre de mitochondries et leur degré de filamentation augmentent durant la période active de synaptogenèse au niveau des protubérances dendritiques *ex vivo* (Li et al., 2004).

Ces travaux menés en particulier sur les cellules souches, semblent donner une signification biologique nouvelle au 'phénotype' mitochondrial fusionné qui devient un critère de cellules différenciées. La différenciation cellulaire nécessiterait donc l'adaptation morphologique des mitochondries qui pourrait être requise pour mettre en place les changements métaboliques qui ont lieu au cours de ce processus. Il est couramment proposé que l'élongation des mitochondries est bénéfique pour l'approvisionnement énergétique mitochondrial (Skulachev, 2001). Dans ce sens, il a été récemment montré que la filamentation mitochondriale permet d'augmenter la surface des crêtes mitochondriales, d'élever la dimérisation des ATPases conduisant à une production plus efficace en ATP (Gomes et al., 2011). Dans ce contexte, il est intéressant de noter que les cellules souches produisent principalement leur ATP par voie glycolytique, alors que l'augmentation du métabolisme oxydatif qui accompagne l'élongation mitochondriale serait nécessaire à leur différenciation (Chung et al., 2007; Mandal et al., 2010). De plus, au cours de la neuritogenèse, l'élongation des mitochondries est associée à une augmentation de leur potentiel de membrane (Voccoli and Colombaioni, 2009). Inversement, une perturbation de l'activité de la chaîne respiratoire par un agent découplant provoque une chute du potentiel de membrane mitochondrial et une fragmentation des mitochondries qui s'accompagnent



d'une rétraction neuritique (Voccoli and Colombaioni, 2009).

Nous avons montré que l'hyperfilamentation qui a lieu 6<sup>e</sup> jour de maturation neuronale s'accompagne d'une élévation du potentiel de membrane mitochondrial, reflétant probablement une activité plus importante de la chaîne respiratoire, phénomène que nous pourrions confirmer par la mesure de la consommation d'oxygène par oxygraphie. Ainsi, l'hyperfilamentation permettrait l'adaptation métabolique des mitochondries face à une demande énergétique accrue lors de la maturation neuronale. Le changement de morphologie des mitochondries des neurones corticaux précède la mise en place de synaptogenèse, que nous avons révélé ici grâce à l'accumulation de marqueurs pré- et post-synaptiques et que nous souhaitons estimer à présent par des expériences de co-localisation de marqueurs pré- et post-synaptiques en microscopie à fluorescence. Le 6<sup>e</sup> jour de culture pourrait donc être un moment clef de la maturation neuronale conduisant à la formation des synapses. L'hyperfilamentation mitochondriale conduirait à une production plus importante en ATP à J6 pour assurer une demande énergétique nécessaire au processus de synaptogenèse. Certains travaux montrent d'ailleurs l'implication de la production de l'ATP d'origine mitochondriale dans la mise en place des synapses. En effet, une augmentation du potentiel de membrane mitochondrial sous l'action de la créatine conduit à une augmentation de la densité des épines et des synapses (Li et al., 2004). D'autre part, l'augmentation de l'activité synaptique, qui demande une quantité accrue d'ATP mitochondrial, est corrélée à une augmentation de la taille des mitochondries au niveau du compartiment dendritique (Chang et al., 2006).

De façon intéressante, le changement transitoire de morphologie des mitochondries s'accompagne d'une élévation transitoire des EAOs. Un des sites majeurs de la production des EAOs est la mitochondrie, plus particulièrement au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire. En conditions physiologiques, la production d'EAOs est directement proportionnelle à l'activité de la chaîne respiratoire (Turrens et al., 1985; Turrens et al., 1982). Ainsi, l'augmentation transitoire d'EAOs que nous observons pourrait traduire une élévation tout aussi passagère de l'activité de la chaîne respiratoire (Phung et al., 1994). L'absence d'effet du traitement antioxydant à J6 sur la morphologie mitochondriale, démontre bien que dans nos conditions, les EAOs ne sont pas responsables de la filamentation transitoire des mitochondries. En effet, l'hyperfilamentation peut être, dans certains cas, une réponse à différents types de stress permettant d'augmenter la synthèse d'ATP (Tondera et al., 2009). D'autre part, il a été décrit qu'une production exacerbée d'EAOs dans des conditions de stress oxydatif, aigu ou chronique, mène au contraire à la fragmentation du réseau mitochondrial. L'élévation de la quantité d'EAOs serait donc une conséquence de l'hyperfilamentation mitochondriale, ce que nous avons souhaité démontrer



en modulant la dynamique mitochondriale dans les neurones corticaux en cours de maturation. Nous avons commencé à aborder la question en modulant l'expression d'OPA1. Nous avons effectivement montré que la fragmentation induite par la diminution d'OPA1 s'accompagne, à J6, d'une diminution de la quantité d'EAOs. Cependant, la modulation du taux d'OPA1 dans les neurones perturbant globalement l'état redox de la cellule (voir ci-après) il est difficile de conclure. Nous souhaitons donc étudier l'effet de la perte de MFN1 sur le pic d'hyperfilamentation et le pic d'EAOs que nous avons observé dans les neurones corticaux à J6.

Nos résultats nous amènent à proposer que le pic de filamentation des mitochondries à J6 permettrait un accroissement de l'activité de la chaîne respiratoire qui mènerait à une élévation transitoire de la quantité d'EAOs. Les EAOs peuvent intervenir en tant que voie de signalisation notamment au niveau de la différenciation neuronale (Prozorovski et al., 2008; Suzukawa et al., 2000; Tsatmali et al., 2005). Les travaux de Tsatmali démontrent qu'une élévation de la production des EAOs est nécessaire à la croissance neuritique et serait concomitante à une augmentation de la quantité du complexe IV de la chaîne respiratoire et de son activité. Nous avons montré une élévation transitoire de la translocation nucléaire du facteur de transcription NRF2 au 6<sup>e</sup> jour de la maturation neuronale. Or, il a été décrit que les EAOs provoquent la translocation nucléaire de NRF2 grâce à l'oxydation de sa protéine régulatrice Keap1 (Min et al., 2011). Récemment, des travaux utilisant un modèle transgénique murin déficient pour la protéine NRF2 ont révélé que NRF2 participe à la différenciation neuronale, les neurones en culture primaire issus de ces souris présentent en effet un retard de croissance neuritique. Il serait intéressant de suivre dans ces neurones en culture la morphologie des mitochondries et l'expression des acteurs de la dynamique mitochondriale. De plus, l'extinction de ce facteur de transcription dans des lignées PC12, empêche la différenciation des neurones induite par le NGF qui normalement permet la libération de NRF2 de sa protéine régulatrice Keap1 (Kosaka et al., 2010; Zhao et al., 2009a). Ainsi, dans nos conditions, l'élévation du niveau des EAOs permettrait la translocation nucléaire de NRF2 qui entraînerait la maturation des neurones par l'activation de cibles qui restent à caractériser. Nos résultats suggèrent donc un rôle nouveau de NRF2 dans la différenciation neuronale au niveau du processus de synaptogenèse. Pour démontrer cette hypothèse, nous souhaitons étudier dans notre modèle cellulaire l'effet d'une diminution du taux de ROS et de NRF2 sur la maturation des neurones, et en particulier sur la synaptogenèse.

*Dans leur ensemble, nos résultats suggèrent la nécessité de l'hyperfilamentation mitochondriale qui conduirait à une signalisation NRF2 dépendante des EAOs pendant la*



*maturation neuronale. Ainsi, comme proposé lors de la différenciation des cellules souches, les mitochondries, lors de la maturation neuronale, pourraient être à l'origine de signaux spécifiques qui permettraient l'activation de facteurs de transcription transitant dans le noyau et modulant la transcription de gènes cibles spécifiques (Mandal et al., 2010).*

***Influence d'OPA1 sur la morphologie et le fonctionnement des mitochondries dans les neurones, impact sur la maturation neuronale :***

En modulant les principales fonctions de l'organelle, dont l'énergétique ainsi que sa distribution, la dynamique mitochondriale pourrait influencer la maturation neuronale. C'est à cette question que nous avons souhaité répondre dans une deuxième partie de ce travail de thèse, en caractérisant les effets de l'inactivation d'OPA1 dans notre modèle de neurones corticaux en développement en culture primaire.

L'extinction de la protéine OPA1 dans les neurones corticaux provoque à J6, comme attendu, la fragmentation des mitochondries (Griparic et al., 2004; Olichon et al., 2003; Song et al., 2007). Les mitochondries fragmentées sont correctement distribuées dans tous les compartiments des neurones transfectés par les siOPA1. Aucune agrégation péri-nucléaire, qui aurait privé les neurites de mitochondries, n'a été observée contrairement à certaines données bibliographiques (Kamei et al., 2005). La fragmentation induite par la perte d'OPA1 ne s'accompagne pas d'un processus d'apoptose spontanée. Néanmoins, les neurones dont la quantité en dynamine OPA1 a été réduite pourraient présenter, comme de nombreux autres types cellulaires une sensibilité accrue à l'apoptose (Arnoult et al., 2005a; Cipolat et al., 2004; Delivani et al., 2006; Frezza et al., 2006; Karbowski et al., 2004a; Lee et al., 2004). Pour le vérifier, nous pourrions induire un stress cellulaire afin d'évaluer la sensibilité des neurones privés d'OPA1 à l'apoptose. Nous pourrions en effet, induire un stress oxydant étant donné que la perte d'OPA1 altère l'état redox de la cellule. Nous pourrions également provoquer un stress excito-toxique par une sur-activation des récepteurs NDMA par le glutamate (Jahani-Asl et al., 2011).

La diminution de la quantité d'OPA1 provoque une baisse du potentiel de membrane mitochondrial dans les neurones comme dans plusieurs autres types cellulaires (Amati-Bonneau et al., 2005; Chen et al., 2005; Cipolat et al., 2004; Lodi et al., 2004; Lodi et al., 2011; Nochez et al., 2009; Olichon et al., 2003; Song et al., 2007; Song et al., 2009). Cette diminution est probablement due à une diminution de la respiration mitochondriale. En effet, une diminution de l'expression d'OPA1 dans des MEF s'accompagne d'une diminution sévère de la respiration endogène (Chen et al., 2005). D'autre part, certains travaux ont



révélé qu'*ex vivo* des fibroblastes ou des muscles de patients atteints d'ADOA-1 en raison de mutations de la protéine OPA1, présentent des défauts de phosphorylation oxydative (Amati-Bonneau et al., 2005; Chen et al., 2005; Chevrollier et al., 2008; Cipolat et al., 2004; Lodi et al., 2004; Lodi et al., 2011; Nochez et al., 2009; Song et al., 2007; Song et al., 2009; Zanna et al., 2008).

En accord avec la baisse du potentiel de membrane que nous avons observée dans les neurones en réponse à l'extinction d'OPA1, nous avons mis en évidence une diminution de la quantité de certains complexes respiratoires. Les complexes I, III et IV sont affectés, alors que la quantité des complexes II et V reste inchangée. La diminution de la quantité de certains complexes respiratoires pourrait entraîner une baisse de leur activité que nous pourrions mesurer par des tests enzymatiques ainsi que par polarographie (Chen et al., 2005; Tang et al., 2009). D'autre part, il serait intéressant d'évaluer si cette perturbation entraîne un déficit énergétique en mesurant la synthèse d'ATP mitochondrial et le ratio ADP/ATP. Il a été montré que la diminution de la quantité d'OPA1 dans des MEF ou dans des fibroblastes de patients porteurs de mutations d'OPA1 affecte, suivant les travaux, la respiration conduite par les complexes I, III et IV (Chen et al., 2005; Chevrollier et al., 2008; Lodi et al., 2004; Zanna et al., 2008). Chez la drosophile, la mutation du gène OPA1 provoque une réduction de la consommation en oxygène conduite par le complexe II ainsi qu'une diminution d'activité des complexes II et III (Tang et al., 2009).

La diminution des complexes respiratoires I, III et IV associée à la perte de la dynamine OPA1 dans les neurones pourrait être expliquée par son rôle dans la structuration des crêtes (Cipolat et al., 2006; Darshi et al., 2010; Frezza et al., 2006; Landes et al., 2010a). La perte d'OPA1 pourrait, entre autres, perturber la structure des super complexes respiratoires et les déstabiliser (Lenaz and Genova, 2009). De manière intéressante, le complexe II qui n'est pas touché par la diminution de la protéine OPA1, n'intervient pas dans la formation des super complexes. Cependant, OPA1 joue également un rôle dans le maintien de l'ADN mitochondrial (Chen et al., 2007; Elachouri et al., 2010). La perte d'une partie de l'ADN mitochondrial pourrait donc provoquer une réduction de l'expression de certaines sous-unités des complexes respiratoires I, III et IV et par voie de conséquence entraîner la dégradation des sous-unités codées par le génome nucléaire. L'ADN mitochondrial ne codant pour aucune des sous-unités du complexe II ou du complexe F1 de l'ATP synthase, ces derniers ne seraient pas affectés. Enfin, un dernier élément à considérer dans le cadre de l'effet de la perte d'OPA1 sur la quantité des complexes respiratoires concerne la mise en évidence de l'interaction de la dynamine avec les complexes respiratoires I, II et III qui pourrait permettre leur stabilité et leur intégrité (Zanna et al., 2008). Néanmoins dans ce cas, le complexe II serait affecté contrairement au complexe IV qui ne



devrait pas l'être.

Nous avons montré pour la première fois chez les mammifères que l'inactivation d'OPA1 conduisait à une augmentation de la production d'EOs grâce à une série d'observations qui bien qu'indirectes, sont assez convaincantes. Nous avons en effet montré que l'activité de l'aconitase, une enzyme sensible aux EAOs est diminuée dans les neurones traités par un siOPA1 alors que l'activité de la catalase, dont la fonction est de détoxifier les EAOs est augmentée. Néanmoins, nous n'observons pas d'augmentation de la quantité des EAOs comme il a été décrit chez la drosophile (Tang et al., 2009), indiquant que, dans notre cas, l'induction de la machinerie anti-oxydante a été suffisamment efficace pour contrebalancer la production d'EOs. Dans ce sens, nous avons mis en évidence une augmentation du rapport du taux de glutathion réduit sur le taux de glutathion oxydé. Pour confirmer une production accrue d'EOs, qui plus est mitochondriale, nous pourrions utiliser la sonde MitoSOX qui s'accumule dans la mitochondrie et qui fluoresce au contact de l'anion superoxyde. De plus, l'évaluation des activités SOD, notamment celle spécifique des mitochondries, mettra également en évidence non seulement une détoxification oxydative mitochondriale mais aussi que les EAOs ont bien une origine mitochondriale. Finalement, l'induction d'un stress oxydatif pourra rendre compte de l'état de sensibilité des neurones, renforçant l'idée d'un déséquilibre oxydatif des cellules dépourvues de la protéine OPA1. Des études sur des modèles de drosophile et sur *C.elegans* porteurs de mutations du gène Opa1 indiquent une fragilité de ces organismes face à un stress oxydant (Kanazawa et al., 2008; Tang et al., 2009).

La perte de la protéine OPA1 entraîne donc un déséquilibre de l'état redox qui pourrait, compte-tenu des résultats que nous avons obtenus dans la première partie de notre travail, induire une perturbation de la signalisation EAOs et par voie de conséquence, une altération de la mise en place des synapses. En effet, alors que l'extinction d'OPA1 n'altère pas la mise en place de l'arborescence dendritique, elle induit une réduction de la quantité de protéines spécifiques des éléments pré- et post-synaptiques. Ceci suggère un rôle particulier de la protéine OPA1 dans le processus de synaptogenèse, que nous souhaiterions caractériser plus avant en déterminant l'effet d'une inactivation d'OPA1 sur le nombre de synapses notamment par immunofluorescence indirecte de protéines représentatives des deux compartiments synaptiques en microscopie à fluorescence.

Nos résultats sont en accord avec des travaux qui montrent que la surexpression de la forme mutée dominante négative de DRP1 dans des neurones hippocampiques en culture primaire, n'interfère pas avec la croissance neuritique mais influence la synaptogenèse (Li et al., 2004). L'inactivation de DRP1 provoque une diminution du nombre d'épines dendritiques



et du nombre de synapses (Li et al., 2008; Li et al., 2004; Wang et al., 2009). De plus, une diminution de chacun des acteurs de la dynamique mitochondriale excepté FIS1 entraîne une diminution du nombre d'épines dendritiques dans des neurones corticaux en culture primaire (Wang et al., 2009). Toutefois, la perte de la protéine DRP1 dans des modèles transgéniques de souris DRP1<sup>+/-</sup> est associée à la fois à une diminution du nombre de synapses et à une réduction du nombre de neurites (Ishihara et al., 2009). Le fait de ne pas révéler ici d'impact de la perte d'OPA1 sur la croissance neuritique pourrait venir de l'extinction tardive de la protéine OPA1 qui a lieu après l'enclenchement du processus de neuritogenèse. Il serait donc intéressant d'utiliser des neurones corticaux de souris porteuses de mutations d'OPA1 à l'état hétérozygote en culture primaire afin d'étudier la mise en place de la croissance neuritique et valider nos résultats dans un contexte physiopathologique.

En conséquence, alors que DRP1 influence la mise en place des synapses par son rôle sur la distribution des mitochondries, l'effet d'OPA1 serait lié à une perturbation du métabolisme oxydatif. En effet, les travaux de Li montrent une perturbation de la distribution des mitochondries dans les neurones surexprimant le dominant négatif K38A de DRP1 sans modifier le potentiel de membrane mitochondrial, alors que dans nos conditions, la perte d'OPA1 ne perturbe pas la distribution des mitochondries mais altère leur activité métabolique (Li et al., 2004).

*Pour conclure, perturber OPA1 contrecarrerait le processus d'hyperfilamentation entraînant une diminution de la phosphorylation oxydative se traduisant à la fois par un déficit énergétique et une perturbation de la signalisation redox et de la synaptogenèse.*

*Afin de mieux caractériser l'effet de la perte de la protéine OPA1 sur le fonctionnement des neurones, nous avons entrepris l'étude de la transmission synaptique par électrophysiologie.*

### ***Influence d'OPA1 sur la transmission synaptique***

Les premières investigations de l'influence de la dynamique mitochondriale sur la transmission synaptique se sont particulièrement centrées sur la fission et ont montré que la perte de DRP1 est impliquée dans le contrôle de la plasticité des épines dendritiques et au niveau pré-synaptique dans le recrutement des vésicules synaptiques du pool de réserve lors de stimulations répétées (Li et al., 2004; Verstreken et al., 2005)

Nos recherches ont mis en évidence, pour la première fois, l'influence de la protéine OPA1 sur la transmission synaptique excitatrice et inhibitrice. Les enregistrements effectués



au niveau du soma des neurones dépourvus d'OPA1 révèlent que l'inactivation de cette dynamine entraîne une altération importante de la fréquence des courants post-synaptiques excitateurs et inhibiteurs, sans effet net sur leur amplitude, bien que la question reste entière pour les courants AMPA.

Les théories classiques de l'électrophysiologie considèrent qu'une perturbation de la fréquence des courants post-synaptiques spontanés sans modulation de leur amplitude s'interprète par des modifications au niveau de l'élément pré-synaptique qui se répercutent sur la libération de neurotransmetteur. Autrement dit, en l'absence de modification nette de l'amplitude, une modulation de la fréquence des courants est classiquement attribuée à une perturbation du fonctionnement des éléments pré-synaptiques des afférences du neurone enregistré. Ceci est corroboré par l'analyse des courants miniatures (ces courants reflétant principalement la probabilité de libération du neuromédiateur), dont seule la fréquence doit être perturbée, leur amplitude restant intacte, ce qui est le cas dans notre travail.

Dans nos conditions expérimentales, étant donné le faible taux de neurones transfectés (environ 5%) et présentant donc une quantité d'OPA1 amoindrie, la plupart des afférences des neurones enregistrés devraient provenir de neurones présentant une quantité normale de dynamine. Dans ce cas, il semble difficile de proposer un impact pré-synaptique direct provoqué par l'extinction d'OPA1, alors que le seul neurone obligatoirement dépourvu d'OPA1 est le neurone enregistré c'est-à-dire l'élément post-synaptique. Cependant, il est important de considérer que la transfection chimique des neurones corticaux, comme celles d'autres types cellulaires, n'est pas homogène et qu'elle conduit à la formation de « foyers de transfection » au sein desquels un groupe de neurones voit leur quantité d'OPA1 diminuée. Un argument supplémentaire en faveur d'un effet « foyer » de la transfection réside dans le fait que la fréquence des courants NMDA spontanés des neurones dépourvus de traceur (donc n'ayant probablement pas été transfectés par les siARN) sont identiques lorsque ceux-ci appartiennent à une population traitée par les siOPA1 ou siLUC. Il n'y a donc pas de propagation de l'effet de l'extinction d'OPA1 aux neurones de l'ensemble de la population, il ne s'agit pas d'une modulation de propriétés de réseau.

L'existence d'un tel foyer permet d'envisager que les effets observés soient dus à la perte de fonction de la protéine OPA1 au niveau des afférences du neurone enregistré. Ils pourraient être alors expliqués par les modifications attendues du compartiment pré-synaptique : une diminution du nombre d'éléments pré-synaptiques, une baisse du nombre de vésicules pré-synaptiques disponibles, voire du nombre de molécules de neurotransmetteur présentes dans les vésicules et libérées dans la fente synaptique lors de



la transmission synaptique spontanée ou encore par un défaut de mobilisation des vésicules comme dans le cas de la jonction neuromusculaire (Verstreken et al., 2005).

Cette interprétation n'est pas univoque puisque, de façon plus générale, les théories électrophysiologiques dites classiques que nous évoquons admettent maintenant qu'une signalisation trans-synaptique rétrograde participe à la régulation de la transmission synaptique (Futai et al., 2007; Tracy et al., 2011). En effet, comme nous l'avons vu dans la partie introductive, la mise en place et le maintien de synapses fonctionnelles requièrent un ajustement coordonné entre tous les composants des compartiments pré- et post-synaptiques. Cette coordination est largement basée sur les interactions entre molécules d'adhérence trans-membranaires, neuroligines et neurexines principalement, et les complexes moléculaires qui leur sont associés, l'ensemble formant un réseau liant les vésicules pré-synaptiques aux densités post-synaptiques, incluant PSD95, et, par extension, aux récepteurs post-synaptiques (Dean and Dresbach, 2006). Ces interactions ont également lieu dans les synapses entre neurones dissociés en culture, comme l'attestent de nombreuses études au travers, entre autres, de la démonstration du contrôle rétrograde exercé par PSD95 sur la taille des synapses excitatrices et la fréquence des courants miniatures (Prange et al., 2004), voire de l'impact des récepteurs post-synaptiques AMPA sur la maturation pré-synaptique (Tracy et al., 2011). Ainsi, une signalisation trans-synaptique rétrograde pourrait participer aux effets de l'absence d'OPA1 dans les neurones dont nous enregistrons les courants post-synaptiques, les conséquences sur les mitochondries seraient ainsi répercutées au niveau pré-synaptique. Les possibilités de modulations des éléments régulateurs restent identiques à celles évoquées plus haut qui résultent en une modification de la libération de neuromédiateurs.

Un argument supplémentaire en faveur d'un effet pré-synaptique est le fait que nous ne déterminons pas d'effet net sur l'amplitude des courants post-synaptiques, notamment au niveau des miniatures à J8 et J9. Ceci suggère que la perte d'OPA1 n'entraîne pas d'altération des éléments post-synaptiques à ce stade de la maturation neuronale.

Toutefois, comme nous l'avons précisé dans la présentation des résultats, il est difficile d'être catégorique dans l'interprétation des tendances ou variations nettes d'amplitudes observées. En effet, l'augmentation de fréquence des courants spontanés peut résulter d'une sommation qui rend difficile la mesure de l'amplitude de chaque événement indépendamment. Ce biais dans les mesures ne concerne pas les fréquences étant donné que le logiciel AxoGraph considère les événements individuellement et donc peut déterminer leur nombre au cours du temps. Ainsi, la détection d'une modification de l'amplitude pourrait résulter de la diminution de la fréquence d'évènements sommés et non d'une véritable



réduction de l'amplitude. L'étude des courants miniatures, en l'absence de potentiel d'action pré-synaptique, réduit le nombre d'événement et rend mieux compte de l'amplitude des courants individuels, ainsi, bien sûr que de leur fréquence. Dans nos conditions, la perte de la protéine OPA1 diminue la fréquence des courants miniatures NMDA et AMPA à J8 et J9 sans en modifier l'amplitude. Nous pouvons donc considérer, d'après les analyses des courants miniatures et spontanés, qu'à J8 et J9, la perte d'OPA1 altère majoritairement la fréquence. En revanche, ne possédant pas encore les enregistrements des courants miniatures à J10, l'effet sur l'amplitude des courants AMPA reste malgré tout à considérer.

La perte d'OPA1 à J10 influence à la fois la fréquence et l'amplitude des courants AMPA, ce qui indiquerait alors un effet non seulement sur l'élément pré-synaptique mais également sur l'élément post-synaptique. L'amplitude des courants AMPA étant diminuée, on assisterait donc à une diminution du nombre de ces synapses ou du nombre de récepteurs par synapse, qui ne serait possible qu'à J10, soit parce que l'effet de l'absence d'OPA1 sur la transmission AMPA nécessite plus de temps pour se mettre en place, soit parce que les éléments en question n'y deviennent sensibles qu'à cette période là de la maturation.

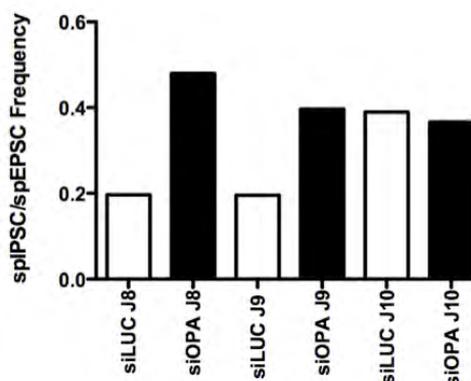
Par conséquent, nos résultats suggèrent une influence de la perte d'OPA1 sur les éléments pré-synaptiques aux stades précoces, sur les éléments post-synaptiques et sur le nombre de synapses efficaces à des stades plus tardifs. La finalisation des études des courants miniatures pourra permettre de déterminer plus finement les contributions post-synaptiques. De plus, la quantification par immunofluorescence des variations des éléments pré- et post-synaptiques, rendra compte du nombre de synapses et des compartiments qui les composent.

Il est particulièrement intéressant de noter que l'impact de la perte d'OPA1 est différente en fonction du type de courant exciteur: (1) la diminution de fréquence survient à J8 et J9 pour les courants NMDA et J10 pour les courants AMPA et (2) les modifications des caractéristiques des courants NMDA sont transitoires (absentes après J10), alors que celles des courants AMPA semblent perdurer au delà de J10. Ceci pourrait être expliqué par le fait qu'au cours de la maturation des synapses en culture, les récepteurs NMDA sont les premiers présents puis, au fur et à mesure, le nombre de récepteurs AMPA augmente. De ce fait, l'effet de la perte d'OPA1 aurait d'abord un impact sur la transmission NMDA, les récepteurs NMDA étant majoritaires à la surface des synapses à J8. Puis, on verrait apparaître un effet sur la transmission AMPA, le nombre des récepteurs AMPA augmentant à J10. Cette hypothèse pourra être confirmée par une estimation du rapport de la quantité des AMPAR sur la quantité des NMDAR (Hall et al., 2007).



Un autre aspect important de nos résultats réside dans le fait que les effets sur la fréquence se déclinent de manière opposée selon la nature des courants. En effet, la perte d'OPA1 provoque une diminution de la fréquence des courants excitateurs, NMDA et AMPA, alors qu'elle entraîne une élévation de la fréquence des courants inhibiteurs GABAergiques. Une influence différentielle de la perte d'OPA1 sur les deux forces majeures de la transmission synaptique n'est pas surprenante étant donnée l'étroite interrelation entre le fonctionnement des transmissions excitatrice et inhibitrice, indispensables à l'homéostasie électrique des réseaux neuronaux. Afin d'empêcher un emballement des circuits neuronaux vers une excitation extrême, le réseau a besoin d'un rétrocontrôle négatif effectué entre autres par la transmission GABAergique pour ramener l'excitation à des niveaux permettant la stabilité du réseau neuronal. *In vivo*, l'activité GABAergique hyperpolarisante permet la stabilisation et la synchronisation de l'activité électrique des circuits neuronaux (Echegoyen et al., 2007; Treiman, 2001). *Ex vivo*, l'activité inhibitrice est dépendante de l'activité excitatrice (Hartman et al., 2006). Ainsi, dans nos conditions, l'augmentation de la fréquence des courants inhibiteurs pourrait être la conséquence d'une réduction de la fréquence des courants excitateurs. Inversement, la réduction de la fréquence excitatrice pourrait être la conséquence d'une inhibition GABAergique trop importante. Là encore, les immunomarquages synaptiques permettront de rendre compte de la part respective de chacun de ces types de transmission.

L'état actuel de nos travaux suggère que la perte d'OPA1 n'entraîne qu'un déséquilibre transitoire des transmissions GABAergique et glutamatergique, visualisée par le rapport des fréquences moyennes des courants inhibiteurs sur celles des courants excitateurs à J10 (Fig. ci-dessous).



Le fait que la perturbation du rapport des transmissions GABAergique et glutamatergique ne soit que transitoire pourrait être liée au fait que les neurones mettent alors en place des systèmes de compensation qui permettent de rétablir une transmission synaptique comparable à celles des neurones contrôles. Alternativement, la perte d'OPA1



pourrait entraîner un simple retard de maturation qui serait rattrapé : le nombre de synapses fonctionnelles serait alors rétabli et les synapses, même en l'absence d'OPA1, seraient finalement comparables fonctionnellement et morphologiquement à celles des neurones témoins.

Cependant, ce retard de maturation peut avoir fragilisé le neurone et ceci pourrait avoir un impact sur la réponse des neurones face à des stress ultérieurs, voire sur la mise en place de connexions *in vivo*, comme nous le verrons ultérieurement.

Dans le cas d'une mise en place d'un processus de compensation dans les neurones en réponse à la perte d'OPA1, des stratégies pourraient s'instaurer pour rétablir une transmission normale en adaptant les éléments pré- et post-synaptiques. Les neurones pré-synaptiques pourraient voir s'élever le nombre de vésicules pré-synaptiques ou encore le nombre de neurotransmetteurs par vésicule pour augmenter le nombre de molécules de neurotransmetteurs libérés dans la fente synaptique. De plus, le neurone post-synaptique enregistré, étant lui-même obligatoirement dépourvu de la protéine OPA1, nous pourrions imaginer qu'il pourrait mettre en place une compensation notamment en augmentant le nombre de récepteurs à la surface ou le nombre d'éléments post-synaptiques, et ce, afin de rétablir l'amplitude des courants à un niveau basal. Cet effet de compensation pourrait être possible au niveau des synapses majoritairement composées de récepteurs NMDA mais pas sur les synapses majoritairement composées de récepteurs AMPA étant donné qu'ils sont atteints plus tardivement et probablement de façon continue, du moins si nos études le confirment.

Ainsi, à J10 la transmission synaptique serait globalement comparable entre les neurones dépourvus d'OPA1 et les neurones contrôles d'un point de vue fonctionnel mais il y aurait une composition synaptique différente. Dans le même ordre d'idées, les expériences de Sun et al en 2009 montrent un déséquilibre transitoire du rapport excitation-inhibition dans des neurones 'nouveaux-nés' de l'hippocampe de souris transgéniques modèles de la maladie d'Alzheimer (Sun et al., 2009). À des stades précoces, ces neurones présentent une augmentation de la fréquence des courants GABAergiques et une diminution des courants excitateurs. À des stades plus tardifs, l'activité électrique est restaurée à des niveaux physiologiques malgré une réduction du nombre total de synapses. En dépit d'un retour à une activité électrique physiologique, la restauration n'est que partielle puisque le nombre global de synapses est toujours anormal.

Comme nous l'avons déjà évoqué, nous devons donc évaluer le nombre d'éléments pré- et post-synaptiques par immuno-cytochimie aux différents stades de nos enregistrements, pour ainsi élucider si dans notre contexte, la compensation électrique s'accompagne ou non d'un rétablissement du nombre de synapses.



D'autre part, il serait utile d'étudier la transmission synaptique dans des conditions où tous les neurones sont touchés par la perte de fonction de la protéine OPA1, comme dans le cas de modèles murins hétérozygotes mutants pour OPA1 (Davies et al., 2007), ou par la transduction virale des neurones par un lentivirus shOPA1. Dans un contexte où tous les neurones sont dépourvus d'OPA1, les effets pourraient être plus sévères et l'adaptation des synapses plus difficile, tous les types cellulaires étant affectés, en particulier les cellules gliales.

En conséquence, quelle que soit l'hypothèse retenue, le caractère transitoire du déséquilibre des transmissions GABAergique et glutamatergique devrait fragiliser les neurones et ceci pourrait avoir un impact sur leur réponse à des stress ultérieurs, voire sur la mise en place de connexions *in vivo*. On pourrait également assister à une amplification de l'effet car, comme nous l'avons discuté dans la première partie de ce manuscrit, étant donné que la perte d'OPA1 entraîne une perturbation de l'état redox cellulaire et une altération du métabolisme énergétique, un stress oxydant devrait exacerber les défauts électriques.

### ***Influence d'OPA1 sur la transmission synaptique : un problème de fonctionnement des mitochondries***

Les effets de la perte de la protéine OPA1 sur la transmission synaptique peuvent être corrélés à l'influence de cette dynamine sur les fonctions mitochondriales. En effet, comme nous l'avons montré, la perte d'OPA1 conduit à une altération du potentiel de membrane mitochondrial et à une diminution des complexes de la chaîne respiratoire, donc probablement de la respiration. Ce qui pourrait mener à une diminution de la production en ATP. Le fonctionnement synaptique nécessite à lui seul 20% de l'ATP mitochondrial indispensable au maintien des concentrations ioniques de part et d'autre de la membrane plasmique et à la transmission synaptique (Duchen, 2000; Nicholls and Budd, 2000). Étant donnée l'influence d'OPA1 sur la fonction métabolique des mitochondries, une perturbation de la dynamique mitochondriale pourrait entraîner un manque local en énergie et perturberait le fonctionnement et la plasticité synaptiques. Les travaux de Verstreken sur des souches de drosophiles hétérozygotes pour une mutation invalidante de DRP1, montrent qu'un défaut de la fission mitochondriale provoque un défaut de recrutement des vésicules synaptiques du pool de réserve lors de stimulations répétées (Verstreken et al., 2005). Ce problème est dû à un manque énergétique puisque l'ajout d'ATP restaure une transmission synaptique efficace en conditions de forte activité neuronale. De même, les travaux de Li indiquent que l'absence de mitochondries à proximité des synapses dans des cultures primaires de neurones hippocampiques induit la réduction du nombre des épines dendritiques. En potentialisant



l'activité mitochondriale par l'intermédiaire de la créatine, ces auteurs restaurent une activité normale, les rares mitochondries bien localisées permettant alors de rétablir le nombre de synapses (Li et al., 2004). La perte d'OPA1 pourrait donc également, en affectant la respiration mitochondriale, entraîner un manque en énergie et perturberait le fonctionnement et la plasticité synaptiques. D'autre part, une diminution de la production d'ATP pourrait altérer le potentiel de repos neuronal. Il serait intéressant de mesurer ce dernier ainsi que les caractéristiques de propagation des potentiels d'action en lien direct avec les régulations ioniques dépendantes de l'ATP. L'activité des récepteurs purinergiques nécessaires notamment dans le maintien du potentiel de membrane des neurones serait aussi intéressante à évaluer mais cela dépasse le cadre de nos investigations.

La mitochondrie est l'un des sites de stockage du calcium intracellulaire et réalise un rôle tampon indispensable au maintien du potentiel de repos et à la transmission synaptique. L'influx du calcium vers la mitochondrie est possible grâce au potentiel de membrane mitochondrial. Lors de fluctuations des concentrations cytosoliques produites par l'activité neuronale, des échanges calciques ont lieu entre la mitochondrie et le réticulum endoplasmique ou encore avec la membrane plasmique. La séquestration du calcium par les mitochondries permet un retour rapide du potentiel de membrane neuronal au repos après des activités synaptiques modérées et intenses (Billups and Forsythe, 2002). Les mitochondries jouent donc un rôle primordial dans le maintien de la transmission synaptique. En effet, lorsque cette fonction est altérée, la concentration cytosolique calcique au repos augmente. Ce qui accroît la probabilité de libération des neurotransmetteurs, d'où un rôle important de la mitochondrie dans la potentialisation synaptique (Dittman et al., 2000). La perturbation de la dynamique mitochondriale par surexpression de la protéine de fission DRP1 dans une lignée de cellules HeLa, entraîne une altération de la séquestration du calcium cytosolique (Szabadkai et al., 2004). De plus, la surexpression de la protéine FIS1 impliquée dans la fission mitochondriale toujours dans les cellules HeLa, ralentit la captation calcique mitochondriale du fait d'un éloignement des mitochondries de la membrane plasmique (Frieden et al., 2004). Ces phénomènes peuvent également se produire dans les neurones.

Dans nos conditions expérimentales, la perte de la protéine OPA1 mène à une perturbation du potentiel de membrane mitochondrial susceptible d'augmenter la concentration calcique intracellulaire au repos et par, voie de conséquence, d'induire un défaut de l'excitabilité neuronale. De ce fait, il serait intéressant de mesurer le potentiel de membrane neuronal, d'évaluer la probabilité de libération des NT et le rôle tampon des mitochondries dans nos conditions. L'utilisation d'une sonde calcique mitochondriale pourrait permettre d'évaluer l'effet de la perte d'OPA1 sur le niveau de calcium intra-mitochondrial.



Pour cela, la mise en culture de neurones corticaux préparés à partir d'une souris transgénique exprimant ce type de sonde serait particulièrement adaptée (Rogers et al., 2007).

Afin d'assurer les rôles métaboliques que nous venons d'évoquer, les mitochondries doivent être bien distribuées pour permettre une gestion locale du calcium et fournir l'énergie nécessaire, notamment au niveau des synapses les plus éloignées. Les mitochondries sont transportées sur de longues distances par l'intermédiaire des microtubules et des moteurs associés. Une fois localisées, elles sont ancrées par l'intermédiaire de réseau des filaments d'actine (Morris and Hollenbeck, 1995). Globalement, dans nos conditions, la perte de la protéine de fusion OPA1 entraîne la fragmentation des mitochondries mais ne perturbe pas leur distribution de manière drastique. Une étude plus fine de leur distribution, en particulier au niveau des zones distales et des synapses, de leur mobilité et de leur vitesse de transport (antérograde et rétrograde) serait bien sûr nécessaire. En accord avec nos données, des études récentes utilisant des neurones ganglionnaires de la racine dorsale en culture primaire, montrent que l'extinction de la protéine OPA1 ne perturbe ni le transport axonal de mitochondries ni leur distribution (Misko et al., 2010). Dans le cas de la perte de fonction de la protéine de fission DRP1, une diminution du nombre de mitochondries, qui restent parfaitement fonctionnelles, aux synapses (Li et al., 2004) est par contre observée. En conséquence, il semble que l'on puisse conclure que si les mitochondries sont absentes ou qu'elles sont présentes mais peu fonctionnelles, le résultat est similaire c'est-à-dire une diminution d'ATP disponible localement. Ainsi, DRP1 serait nécessaire pour augmenter le nombre et la mobilité des mitochondries vers les synapses en fonction de l'activité neuronale alors qu'OPA1 permettrait d'augmenter la production d'ATP des mitochondries en particulier à proximité des synapses.

### ***Effet de la Forskoline sur les dysfonctions synaptiques occasionnées par la perte de la protéine OPA1.***

Étant donné les effets éventuels pré-synaptiques de la perte d'OPA1, un traitement à la Forskoline (FSK) connu pour optimiser l'activité synaptique, nous a paru un candidat de choix pour rétablir les perturbations observées. En effet, la FSK permet l'activation de l'adénylate cyclase qui produit de l'AMPc et par voie de conséquence active la PKA fortement impliquée dans la plasticité synaptique au niveau de l'élément pré-synaptique. La potentialisation des synapses dépend de l'adénylate cyclase globalement au niveau de l'élément pré-synaptique où l'élévation d'AMPc permet, entre autres, le recrutement des vésicules synaptiques (Chavis et al., 1998; Verstreken et al., 2005; Zalutsky and Nicoll,



1990) mais également, à un degré moindre, au niveau du compartiment post-synaptique (Blitzer et al., 1998; Gomez et al., 2002). Dans nos conditions, la FSK permet de compenser l'effet de la perte de la protéine OPA1 sur la fréquence des courants excitateurs. Cette compensation pourrait être le fait de l'action de la FSK sur le fonctionnement synaptique, sans intervention directe de la molécule sur la mitochondrie.

Cependant, de récentes études montrent l'influence de la voie Adénylate cyclase/AMPC/PKA sur le fonctionnement mitochondrial (Dagda et al., 2011; Pasdois et al., 2003). Cet effet mitochondrial de la FSK pourrait être d'accroître la biogenèse mitochondriale et ainsi d'élever la production d'ATP en augmentant la masse mitochondriale (De Rasmio et al., 2010) et, partant, la quantité d'énergie disponible pour les synapses. Ceci paraît peu probable dans nos conditions étant donné le temps entre le traitement et l'enregistrement électrophysiologique (près d'une heure), qui semble insuffisant pour la mise en place de processus de transcription et de traduction de protéines nécessaires à la biogenèse mitochondriale. A plus long terme, ceci pourrait être éventuellement vérifié notamment en évaluant la masse mitochondriale par des protéines mitochondriales représentatives de la biogenèse ou par la quantification de l'incorporation de BrdU dans l'ADN mitochondrial (Amiri and Hollenbeck, 2008). De plus, une stimulation de la biogenèse mitochondriale pourrait être appréciée en étudiant l'expression des principaux acteurs qui contrôlent ce processus comme le coactivateur transcriptionnel PGC1-alpha et ses gènes cibles.

Outre son influence sur la biogenèse, la FSK pourrait élever l'activité mitochondriale en restaurant une morphologie mitochondriale filamenteuse. Des travaux assez récents montrent que la PKA provoque l'élongation des mitochondries par inactivation de la protéine DRP1 dans les cellules HeLa (Chang and Blackstone, 2007a). Dans notre cas, le traitement à la FSK ne permet pas l'élongation des mitochondries dans les neurones dépourvus d'OPA1. Cela peut être expliqué par le fait que la quantité de la protéine OPA1, un des acteurs majeurs de la fusion mitochondriale, est diminuée. En effet, Gomes et al. montrent que la PKA se trouve dans l'incapacité de déplacer l'équilibre de la dynamique mitochondriale vers les forces de fusion dans des fibroblastes mutants OPA1-/- contrairement aux fibroblastes MFN1-/- et MFN2 -/- où les mitochondries filamentent (Gomes et al., 2011). Cependant, même dans les neurones contrôles, la FSK ne permet pas l'élongation mitochondriale, montrant que la FSK, dans nos conditions, n'a pas d'effet sur la morphologie des mitochondries.

Enfin, la FSK pourrait agir directement sur la chaîne respiratoire notamment en augmentant l'activité de certains complexes. En effet, la FSK agirait sur le complexe I de la chaîne respiratoire par le biais de l'adénylate cyclase et permettrait une production plus



importante d'ATP (Pasdois et al., 2003). De plus, la PKA associée à la membrane externe mitochondriale par des protéines kinases d'ancrage (AKAP) et activée indirectement par un traitement à la FSK, permettrait de restaurer des dysfonctions mitochondriales (augmentation de la consommation en oxygène, de la capacité respiratoire mitochondriale et du potentiel de membrane mitochondrial) dans des cellules dérivant de souris KO pour PINK1 (Dagda et al., 2011). Néanmoins, l'effet direct de la FSK sur la mitochondrie est controversé. En effet, certains auteurs montrent que l'AMPc cytosolique n'interviendrait pas sur l'activité de la chaîne respiratoire et que la FSK n'agirait pas directement sur la production d'AMPc mitochondrial et donc sur la régulation de la respiration (Acin-Perez et al., 2009). De plus, cette équipe a découvert l'existence d'une adénylate cyclase mitochondriale à profil bactérien qui permet d'augmenter le taux d'AMPc matriciel susceptible d'activer la PKA matricielle qui, par la suite, augmenterait l'activité de la chaîne respiratoire par la phosphorylation des complexes. Quoi qu'il en soit, afin de déterminer si la FSK exerce une action sur l'activité mitochondriale, nous pourrions à court terme mesurer le potentiel de membrane mitochondrial dans des neurones traités à la FSK en l'absence d'OPA1 à l'aide de la sonde JC-1.

### ***Impact de nos travaux sur la compréhension de l'ADOA-1 et des processus de neurodégénérescence***

Les premières observations menées sur des patients atteints de la pathologie ADOA-1 porteurs de mutations du gène Opa1 ont décrit une altération spécifique des cellules ganglionnaires de la rétine. La découverte plus récente de formes syndromiques de cette pathologie a permis d'élargir le tableau clinique et de révéler des atteintes multiples du SNC comme une altération du nerf auditif et l'apparition de lésions cérébrales, accompagnées, chez certains patients, de problèmes musculaires (Yu-Wai-Man et al., 2010). Ainsi, les dysfonctions d'OPA1 se révèlent cruciales non seulement pour les cellules ganglionnaires mais également pour d'autres types de neurones. Nos investigations sur les neurones corticaux pourraient donc conduire, en permettant une compréhension globale du rôle d'OPA1 dans la maturation et la physiologie des neurones, à une meilleure compréhension de l'ADOA-1. Nous avons en effet établi que l'extinction d'OPA1, qui mime les processus d'haploinsuffisance, et l'expression d'un mutant pathogène dominant négatif, perturbent la transmission synaptique.

En conclusion de cette deuxième partie de notre travail, nos résultats montrent qu'OPA1 serait un acteur important dans la régulation de la plasticité synaptique grâce à une modulation des fonctions mitochondriales. En effet, nous avons établi que l'extinction



d'OPA1, qui mime les processus d'haploinsuffisance, ou l'expression d'un mutant pathogène dominant négatif, perturbe la transmission synaptique et affecte le potentiel de membrane mitochondrial.

Nos résultats montrent que l'inactivation d'OPA1 conduit à une altération du fonctionnement de la transmission synaptique sans toutefois mener à la mort neuronale. Nos conditions expérimentales pourraient donc mimer les phases précoces de la maladie qui conduiraient à plus long terme à la dégénérescence des neurones qui survient chez les patients atteints d'ADOA-1. En accord avec cette hypothèse, il a été récemment montré dans un modèle de souris hétérozygote OPA-/+ qu'une altération des dendrites des cellules ganglionnaires de la rétine précède la dégénérescence globale du neurone et la déficience visuelle (Williams et al., 2010). Dans le deuxième modèle murin d'ADOA-1, les cellules ganglionnaires de la rétine présentent à des stades précoces des perturbations électrophysiologiques caractérisées notamment par une amplitude réduite des potentiels visuels évoqués et des temps de latence allongés, phénomènes retrouvés chez les patients (Heiduschka et al.). A ces stades, ils n'observent pas de rétraction des axones, ni aucune déconnexion, mais, à des stades plus tardifs, les cellules ganglionnaires de la rétine dégénèrent. Ainsi, nos résultats permettent d'imaginer que les défauts électrophysiologiques intervenant précocement au niveau des cellules ganglionnaires de la rétine pourraient être dus à un défaut de transmission synaptique.

En perspective, il apparaît donc primordial de poursuivre nos investigations sur des modèles intégrés de transmission synaptique et nous évoquerons ici quelques pistes. Ainsi, les modèles transgéniques d'haploinsuffisance permettraient d'élargir les recherches à l'échelle tissulaire (tranches, cultures organotypiques) ou à celle de l'animal. Etant donné le rôle que nous avons mis en évidence d'OPA1 sur la transmission synaptique au cours de la maturation neuronale, il serait intéressant d'élargir nos recherches à l'étude de l'influence de cette dynamine sur des synapses matures. En effet, les synapses établies sont soumises à des processus d'adaptation et de plasticité autres que ceux intervenant au cours de leur développement et qui pourraient être influencés par la protéine OPA1. Ainsi, les analyses électrophysiologiques des phénomènes de facilitation à court et long terme, fortement liés à l'adaptation synaptique, permettraient de rendre compte de l'importance d'OPA1 dans la plasticité et le renforcement de voies synaptiques, qui pourraient offrir de nouveaux axes de compréhension de l'ADOA-1 et, partant, d'autres maladies neurodégénératives. La plasticité synaptique étant altérée dans les maladies neurodégénératives notamment celles liées au vieillissement, l'altération de la dynamique mitochondriale pourrait accélérer le vieillissement. En effet, les neurones adultes en culture primaire montrent que plus les neurones sont âgés,



plus ils présentent des défauts métaboliques (Brewer and Torricelli, 2007; Parihar and Brewer, 2007). De plus, l'âge est un facteur favorisant la sensibilité des neurones à l'excitotoxicité. Il serait intéressant d'étudier si la dynamique mitochondriale est également altérée et si une surexpression d'OPA1 pourrait pallier les défauts métaboliques liés à l'âge, et ce, d'autant plus que la surexpression d'OPA1 peut protéger les neurones primaires de l'excitotoxicité NMDA-dépendante (Jahani-Asl et al., 2011). De plus, l'éventuelle implication de la dynamique mitochondriale pourrait être étudiée dans un modèle murin transgénique qui présente une accélération spontanée du vieillissement possédant entre autres des dysfonctions mitochondriales (Nakahara et al., 1998; Takeda et al., 1981).

De tels travaux complèteraient des études révélant l'implication des acteurs de la dynamique mitochondriale dans d'autres maladies dégénératives liées au vieillissement. Ainsi, des formes génétiques de la maladie de Parkinson montrent une altération du 'contrôle qualité' mitochondrial sous la dépendance de la dynamique mitochondriale (Vives-Bauza et al., 2011). La dynamique mitochondriale semble également altérée dans des cerveaux de patients atteints de la maladie de Huntington (Bossy-Wetzel et al., 2008; Kim et al., 2010; Oliveira, 2010) avec des niveaux protéiques augmentés pour DRP1 et FIS1 (Costa et al., 2010), qui interagiraient avec la protéine huntingtine (Song et al., 2011), et au contraire diminués pour les Mitofusines et OPA1 (Shirendeb et al., 2011). Le même phénomène est également observé dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer qui présentent une diminution des protéines DRP1 et OPA1 (Wang et al., 2008).

L'implication de la dynamique mitochondriale dans la majeure partie des pathologies neurodégénératives est donc un argument supplémentaire en faveur de la poursuite des investigations concernant la part jouée par la protéine OPA1 dans la physiologie neuronale.



## CONCLUSION GENERALE

Notre travail a confirmé que l'inactivation d'OPA1 perturbe l'énergétique mitochondriale et a montré pour la première fois qu'elle provoque chez les mammifères une altération de l'état redox. Ces processus conduiraient à des dysfonctions neuronales illustrées ici par une diminution de protéines clefs des éléments pré- et post-synaptiques et une altération de la transmission synaptique glutamatergique et GABAergique.

Ces perturbations pourraient également, suivant les types cellulaires, s'amplifier au fil du temps jusqu'à la dégénérescence. Qui plus est, les cellules ne sont pas égales face à leur environnement. Les neurones, du fait de leur quiescence, de leur morphologie et de leur forte consommation énergétique sont plus facilement sensibles à des dysfonctions mitochondriales, comme l'illustrent les nombreuses maladies neurodégénératives associées à des défauts mitochondriaux. Les inégalités persistent entre les différents types de neurones. Les cellules ganglionnaires de la rétine sont des neurones particulièrement sensibles à des troubles de l'apport en oxygène, ont un axone très long qui possède une partie démyélinisée et qui de ce fait, demande une grande quantité d'énergie pour la conduction du message nerveux. Outre leur sensibilité à un défaut métabolique, ces neurones sont confrontés à des agressions extérieures comme les UV qui sont susceptibles d'engendrer un stress oxydant pouvant entraîner leur dégénérescence (Lenaers et al., 2009). De ce fait, l'association de stress pro-oxydants à une perturbation de l'état redox provoquée par la perte de la protéine OPA1, comme nous l'avons montré, devrait conduire les neurones à la dégénérescence. Conséquemment, ce « scénario catastrophe » peut être appliqué à tous les types neuronaux qui présentent au cours du vieillissement des défauts métaboliques et oxydatifs. En définitive, la compréhension des fonctions d'OPA1 dans le maintien des neurones pourrait aider à mieux aborder non seulement l'ADOA-1 mais aussi d'autres maladies neurodégénératives.



## MATERIELS ET METHODES

### I- Culture primaire de cellules de cortex d'embryons de rat E17

#### I-1- Prélèvement, microdissection et mise en culture

Les expériences sont réalisées sur des rates Wistar gestantes à E17 (Janvier). Les animaux sont maintenus dès leur arrivée dans une pièce éclairée 12 heures par jour, à la température de 22°C et disposent d'eau et de nourriture à volonté.

Les rates sont anesthésiées par injection intra-péritonéale de pentobarbital sodique (100mg/kg). L'abdomen est incisé, les deux cornes utérines sorties puis les sacs vitellins extraits. Les fœtus sont prélevés, les têtes sectionnées et rincées dans du PBS-glucose (6g/l) à 4°C. La dissection des cortex est effectuée sous loupe binoculaire dans du PBS-glucose (6g/l) à 4°C puis les cortex sont transférés dans une quantité minimale de PBS à 4°C (environ 10 cortex par tube Falcon 15ml).

Une dissociation enzymatique est réalisée à l'aide d'une solution de papaïne (10U/ml) dans du PBS pendant 15 minutes à 37°C, sans agitation. La réaction est stoppée par addition de 2 volumes d'une solution de DNase (200U/ml) et de B27 (1x) dans du PBS-glucose, 5 minutes à température ambiante. Le volume est ensuite complété à 5 ml (par tube de 15ml) et l'on procède à une dissociation mécanique grâce à une dizaine d'« aller-retour » dans une pipette de transfert.

La suspension cellulaire est filtrée (filtres 70 µM) et centrifugée (10min à 120g). Chaque culot est repris dans 5ml de milieu complet. Après filtration sur coussin de BSA stérilisée (80mg/ml Neurobasal), la suspension cellulaire est centrifugée à 120g pendant 10 minutes à température ambiante. Chaque culot est repris dans 5ml milieu complet.

Les cellules sont comptées avec une cellule de Malassez, ensemencées à 400000 cellules par ml par boîte P35 (600000 cellules/boîte) et placées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

#### Solutions, réactifs, milieux

- PBS sans Ca<sup>2+</sup>Mg<sup>2+</sup> (Eurobio CS1PBS01-01)
- D-(+)-Glucose (Sigma G8270)
- Papaïne (Sigma, P4762)
- DNase (Sigma, D4527)
- BSA (culture grade, Sigma A9418)
- poly-D-lysine (Sigma, PM 30000-70000, P7280)

#### Milieu de culture : - Neurobasal A-25 (Invitrogen, 10888-022),

- Antibiotiques (Penicillin/Streptomycin 10000U/ml, Sigma),
- Antifongique (Amphotericin B 250U/ml, Invitrogen),
- Acide L lactique (Sigma **L1750**), 0,9 mg/ml H<sub>2</sub>O final,
- B27 serum-free supplement 50x (Invitrogen, 17504-44),
- Glutamine 1mM final (Invitrogen 25030-024)

## I-2- Culture, viabilité cellulaire

Les cellules corticales sont ensemencées (400000 cellules par ml) dans des boîtes de Pétri (Nunc, 35 mm de diamètre) préalablement recouvertes de poly-D-lysine (PDL, 100µg/ml, pendant 2 à 12h à 37°C) pour favoriser l'adhérence des cellules. Pour permettre les expériences d'immunofluorescence, des lamelles de verre (12mm de diamètre) sont déposées sur le fond d'une partie des boîtes et traitées par la PDL. Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub> (95%air-5%CO<sub>2</sub>). La moitié du milieu culture est changée pour la première fois le sixième jour et est ensuite changée tous les 3 jours.

Pour obtenir des cultures sans astrocytes, les cellules sont traitées par 5µM d'arabinoside C à J0 pendant 24h. Le milieu de culture est ensuite totalement changé et les cellules récupérées après 8 jours de culture. Parallèlement, les cultures astrocytaires préparées à partir d'embryons E20 ont été fournies par l'équipe du Dr. Pénicaud.

La viabilité cellulaire est mesurée par un test d'exclusion au Bleu Trypan. Le tapis cellulaire est rincé deux fois dans du PBS puis incubé 2 min avec du Bleu Trypan dilué dans du PBS (0,2%).

## I-3- Immunofluorescence indirecte

L'ensemble de ce protocole s'effectue à température ambiante sur les cellules ensemencées sur lamelles de verre :

- laver les lamelles avec du PBS 1X.
- fixation : incuber avec 3,7% de Formaldéhyde dans du PBS 1X, préchauffé à 37°C, durant 20 minutes.
- laver 2 fois par du PBS 1X.
- perméabilisation : incuber pendant 15 minutes dans du PBS 1X 0,3% Triton X-100.
- laver 2 fois par du PBS 1X.
- blocage des sites non spécifiques : incuber pendant 2 heures avec du PBS 1X 3% sérum de chèvre, 5% BSA et 0,5% Tween-20.
- incuber 1heure avec les anticorps primaires dilués dans du PBS 1X 3% sérum de chèvre, 5% BSA et 0,5% Tween-20.
- laver 3 fois pendant 5 minutes dans du PBS 1X 3% sérum de chèvre, 5% BSA et 0,5% Tween-20.
- incuber 40 minutes avec les anticorps secondaires dilués dans du PBS 1X 3% sérum de chèvre, 5% BSA et 0,5% Tween-20.
- laver 2 fois pendant 5 minutes dans du PBS 1X 3% sérum de chèvre, 5% BSA et 0,5% Tween-20 et laver 1 fois pendant 5 minutes dans du PBS 1X.
- détection des acides nucléiques : incuber avec du Hoechst dilué dans du PBS 1X (0,5 mg/ml) pendant 1à minutes.
- laver 1 fois PBS 1X et 1 fois avec de l'eau.
- montage : monter les lamelles sur lames avec du Mowiol.

Pour la visualisation de NRF2, il est nécessaire de réaliser une étape de perméabilisation supplémentaire au méthanol (-20°C) pendant dix minutes. Cette étape se fait entre la perméabilisation au triton et la saturation.

Une fois sèches, les lames sont conservées à 4°C. Les observations sont réalisées au microscope à fluorescence (Nikon Eclipse 80i) et les images acquises avec NIS-Element (Nikon Digital Sight DSU2 camera) sont traitées avec le logiciel Metamorph.

Anticorps primaires:

- anti-OPA1 (produit chez le lapin et purifié au laboratoire), 1/50
- anti-OXPPOS (Mitosciences) : 1/50
- anti-ATPsynthase  $\beta$  (Molecular Probes), 1/200
- anti-NeuN (Chemicon), 1/1000
- anti-S100 $\beta$  (Swant), 1/1000
- anti-Synaptophysine (Abcam), 1/1000
- anti-PSD95 (Abcam), 1/1000
- anti-Synapsine (Synaptic Systems) : 1/800
- anti-MAP2 (SIGMA) : 1/1000
- anti- $\beta$ -3-tubuline (SIGMA) : 1/1000
- anti-NRF2 (Santa Cruz Biotechnology), 1/50

Anticorps secondaires: anti-souris et anti-lapin Alexa 594 et 488 (Molecular Probes, 1/800)

#### **I-4- Mesure de la quantité d'EAOs**

La quantité d'EAOs est mesurée à l'aide la sonde 2',7'-dichlorofluorescéine diacétate (H2-DCFDA, Molecular Probes). Cette molécule, une fois clivée par les estérases cellulaires, réagit avec l' $H_2O_2$  et les radicaux péroxydés en émettant un signal fluorescent.

Protocole :

- ajouter la sonde H2-DCFDA à 4 $\mu$ M final directement dans le milieu de culture
- incuber 30 minutes dans l'étuve à 37°C
- mettre les boîtes sur glace à l'abri de la lumière.
- laver 1 fois avec du PBS à 4°C
- aspirer et stocker les boîtes rapidement à 4°C.
- décongeler les boîtes à température ambiante.
- gratter 2 fois les cellules dans 150 $\mu$ l d' $H_2O$ .
- déposer 200 $\mu$ l dans une microplaque opaque et effectuer le dosage des EAOs en utilisant un fluorimètre (Wallac Victor lex de 490 nm,  $\lambda_{em}$  de 535 nm)
- réaliser un dosage protéique des extraits sur les échantillons en triplicate en utilisant le Kit DC Protein Assay (Biorad) en utilisant un lecteur de plaque (Perkin Elmer).

## **I-5- Protocole de décollement des neurones pour tests enzymatiques**

Nous utilisons un protocole de décollement des cellules identique à celui mis au point pour analyser les neurones en FACS. Les culots de cellules sont ensuite utilisés pour les dosages d'activité des enzymes aconitase, catalase et de la mesure de l'état redox.

Protocole :

- laver une fois PBS 1X 37°C
- incuber 25 minutes à 37°C avec de la trypsine (Trypsine 0,25% sans EDTA, 400µl par P35) préalablement chauffée à 37°C
- mettre 1ml de PFN à 37°C pour arrêter l'action de la trypsine
- culotter les cellules à 200g pendant 10 minutes à 4°C
- resuspendre les culots dans du PFN
- centrifuger les cellules à 200g pendant 10 minutes, aspirer le milieu au maximum
- congeler les culots secs dans l'azote liquide et les stocker à -80°C.

- Milieu PFN : pour 50ml, 200µl EDTA 2mM, 1ml de SVF 2% dans PBS 1X (sans Calcium, sans magnesium)

## **I-6- Mesure de l'état redox**

La collaboration avec Anne Galinier de l'équipe de Louis Casteilla (StromaLab, Inserm1031 UMR5273, CHU Rangueil, Toulouse) nous a permis la mesure des formes réduites et oxydées du glutathion (le rapport du glutathion réduit / glutathion oxydé donne un bon aperçu du statut redox de la cellule). La mesure est réalisée par une technique de chromatographie différentielle sur colonne (HPLC sur le plasma). La phase mobile passe dans la colonne qui sépare les différentes molécules. Les molécules passent une par une dans une cellule de détection électrochimique, ce qui permet un comptage des électrons sur chaque molécule (la captation des électrons labiles), qui dépend de l'état d'oxydo-réduction. Nous obtenons une représentation de 2 pics (surface / nombre d'électrons). Le premier pic correspond au glutathion réduit et le second au glutathion oxydé.

- déprotéiniser les culots secs par ajout de 200µl d'acide Métaphosphorique
- vortexer pendant 1 minute
- centrifuger 3 minutes
- récupérer le surnageant qui contiennent le glutathion
- ajouter au culot 50µl d'H<sub>2</sub>O et soniquer jusqu'à complète solubilisation
- passer sur colonne HPLC

- réaliser un dosage protéique des extraits sur les échantillons en triplicate en utilisant le Kit DC Protein Assay (Biorad) en utilisant un lecteur de plaque (Perkin Elmer).

### **I-7- Mesure de l'activité Aconitase**

L'aconitase est notamment une enzyme du cycle de Krebs. L'anion superoxyde inactive l'aconitase par oxydation directe. Son activité est mesurée par spectrophotométrie à partir d'un lysat de cellules. L'aconitase catalyse la conversion entre le citrate et l'isocitrate. La mesure de l'activité aconitase est réalisée de manière indirecte par le dosage du NADPH. En effet, le NADPH est formé lors de la conversion de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate par l'isocitrate déshydrogénase. Ainsi, plus l'aconitase est active, plus il y a aura une formation de NADPH.

Protocole :

- lyser les échantillons dans 200µl de tampon aconitase à l'aide du tissue lyser (Qiagen).
- mettre 200µl tampon + substrat + NADP<sup>+</sup> + enzyme + lysat cellulaire dans une cuve de verre.
- mesurer la densité optique à 340 nm à 37°C pendant 40 minutes.
- Calculer la pente de la courbe.
- réaliser un dosage protéique des extraits sur les échantillons en triplicate en utilisant le Kit DC Protein Assay (Biorad) en utilisant un lecteur de plaque (Perkin Elmer).

L'activité spécifique de la catalase à 37°C est exprimée en milli unité d'enzymes par mg de protéines.

Produits :

- Tampon Tris HCl , pH 7,4
- Substrat Trisodium Citrate pH 7,4
- Isocitrate déshydrogénase
- NADP<sup>+</sup>

### **I-8- Mesure de l'activité Catalase**

La catalase est une enzyme de la machinerie antioxydante qui décompose le peroxyde d'hydrogène en eau et en oxygène. Le dosage consiste en la mesure de l'oxygène dégagé par la catalase en présence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

- lyser les échantillons dans 100µl de tampon aconitase à l'aide du tissue lyser (Qiagen)
- mettre 1ml de solution d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à 19mM dans du PBS dans une cuve à Quartz.
- ajouter 20µl d'échantillon et agiter directement dans la cuve
- mesurer la densité optique à 240 nms à 25°C pendant 3 minutes 30 toutes les 20 secondes
- Calculer la pente de la courbe
- réaliser un dosage protéique des extraits sur les échantillons en triplicate en utilisant le Kit DC Protein Assay (Biorad) en utilisant un lecteur de plaque (Perkin Elmer).

L'activité spécifique de la catalase à 25°C est exprimée en µmoles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> décomposées par minute et par mg de protéines.

### **I-9- Mesure du potentiel de membrane mitochondrial**

JC-1 ou le 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide, est une sonde cationique lipophile fluorescente. JC-1 se présente sous forme de monomères lorsqu'elle est à faible concentration et sous forme d'agrégats à de fortes concentrations qui fluorescent à des longueurs d'onde différentes (Smiley et al. 1991).

- ajouter la sonde JC-1 (Invitrogen DMSO) à 2µg/ml directement dans le milieu
- incuber 20 minutes dans l'étuve à 37°C.
- mettre les boîtes sur glace et à l'abri de la lumière.
- laver une fois avec du PBS 1X à température ambiante.
- gratter les cellules dans 200µl d'H<sub>2</sub>O
- déposer 200µl dans une microplaque opaque et effectuer le dosage des monomères de JC-1 et des agrégats en utilisant un fluorimètre (Wallac Victor  $\lambda_{exc}$  monomère de 485 nm,  $\lambda_{em}$  monomère de 530 nm ;  $\lambda_{exc}$  agrégat de 535 nm,  $\lambda_{em}$  agrégat de 590 nm).
- faire le rapport des valeurs d'émission des monomères sur les valeurs d'émission des agrégats.

### **I-10- Transfection des cultures embryonnaires par électroporation**

Les cellules ont été transfectées avec des siARN ou des plasmides par nucléofection (LONZA/ AMAXA) suivant les instructions des fournisseurs. Les expériences d'interférence à l'ARN sont réalisées avec un pool de 4 siARN OPA1 (3µg), d'un siARN OPA1 individuel ou le siRNA Luciférine (Dharmacon). La visualisation des mitochondries a pu être notamment possible par la co-nucléofection des siARN avec le vecteur mitoDsRED codant pour une protéine fluorescente dirigée à la mitochondrie.

- dès la dissociation, culotter 5 millions de neurones à 120g pendant 5 minutes à température ambiante
- sous la hotte, reprendre le culot cellulaire avec le produit de Nucléofection AMAXA et les acides nucléiques (3µg siARN et 1µg de vecteur MitoDsRED) et mettre l'ensemble dans une cuve d'électroporation
- réaliser le programme G-013, ajouter 500µl de milieu à 37°C
- ensemercer les cellules dans les boîtes de Pétri
- changer totalement le milieu après 2 heures d'incubation à 37°C.

### **I-11- Electrophorèse, transfert, immunodétection**

Extractions de protéines totales cellulaires :

Systématiquement, plusieurs boîtes sont traitées par conditions (10 boîtes de J2 à J6, 5 boîtes de J8 à J12) :

- gratter les neurones primaires dans le milieu de culture

- centrifuger à 600g, 5 minutes, à 4°C
- rincer les culots au PBS 1X à 4°C
- centrifuger à 600g, 5 minutes, à 4°C
  - Alternativement : congeler dans l'azote liquide et les stocker dans un congélateur -80°C et décongeler alors les échantillons sur glace
- remettre les culots en suspension dans le tampon de lyse et incubé 30 minutes avec homogénéisation au vortex toutes les 10 minutes.
- centrifuger à 20000g, 10 minutes, à 4°C.
- doser les protéines présentes dans la fraction soluble par la méthode de Bradford (Biorad).
- dénaturer les échantillons protéiques à 95°C durant 5 minutes dans du tampon LSB.

#### Protocole pour Western Blot dans dosage protéique, calibré pour 1 boîte P35

- reprendre les culots dans 40µl de LSB2X.
- vortexer 1 minute.
- chauffer 5 minutes à 95°C.
- soniquer 2 fois 5 minutes
- ALTERNATIVEMENT pour la détection par les anticorps OXPHOS qui n'est pas compatible avec la dénaturation par la chaleur, soniquer 2 fois 15 minutes.

#### Tampon de lyse :

- Tris HCl 50mM pH 7,5
- NaCl 250mM
- EDTA 5 mM
- EGTA 5mM
- Triton X-100 0,1%
- DTT 1 mM
- SDS 0,1%
- DOC 0,1%
- NP40 1%
- 1X inhibiteurs de protéases : cocktail Roche

#### Tampon LSB (Laemmli Sample Buffer) :

- Tris-HCl pH 6.8 62,5 mM
- SDS 2%
- β-mercaptoéthanol 5%
- glycérol 10%
- bleu de bromophénol 0,01%

Les protéines sont séparées par électrophorèse de type SDS-PAGE (9 ou 15% acrylamide, selon les protéines détectées), électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose. Les étapes de saturation sont réalisées dans du TBS, 0,2% Tween et 5% lait (TBSTL), pendant 1h à température ambiante. Les membranes sont incubées avec les anticorps primaires, dilués dans du TBSTL, pendant la nuit à 4°C, lavées par du TBST, incubées 1h à température ambiante avec des anticorps secondaires dans du TBSTL. La

membrane est ensuite lavée par du TBST et révélée par chimio-luminescence (Kit ECL Perkin Elmer Life Science).

L'analyse densitométrique des signaux obtenus a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health ; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

#### Anticorps primaires:

- anti-OPA1 (BD Biosciences), 1/300
- anti-DRP1 (BD Biosciences), 1/200
- anti-MFN1 (don de M. Rojo Paris), 1/50
- anti-MFN2 (Abnova), 1/200
- anti-GFAP (Abcam), 1/1000
- anti-Synaptophysine (Abcam), 1/1000
- anti-Synapsine (Synaptic Systems) : 1/800
- anti-PSD95 (Abcam) : 1/1000
- anti-OXPHOS (Mitosciences) : 1/200
- anti-Aconitase (Abcam) : 1/2000
- anti-Catalase (Abcam) : 1/2000
- anti-SOD1 (Epitomics) : 1/2000
- anti-SOD2 (Epitomics) : 1/2000
- anti-ATPsynthase  $\beta$  (Molecular Probes), 1/200
- anti-HSP60 (Sigma), 1/200
- anti-Actine (Chemicon), 1/100000

Anticorps secondaires: anti-souris et anti-lapin HRP (1/10000, Abcam)

### **I-12- Analyse morphométrique des mitochondries**

L'analyse morphométrique des mitochondries a été réalisée à l'aide du logiciel ImageJ (National Institutes of Health ; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), à partir d'images de microscopie confocale (Leica SP2) de la plateforme d'imagerie TOULOUSE RIO IMAGING.

- faire une projection des images (stack) pour avoir les mitochondries sur toute la profondeur cellulaire
- convertir les images en  $\mu\text{m}$  « Properties »
- enregistrer l'image ainsi convertie en format Tiff.
- binariser l'image après avoir choisi le « Threshold »
- entourer les parties des photos à compter puis mesurer par « Analyse Particle »
- ouvrir un dossier Excel pour l'image
- prendre les valeurs de « Major » correspondant au diamètre le plus grand de l'événement mesuré
- ranger les valeurs par ordre croissant et prendre les valeurs supérieures à la limite de résolution ( $>0,3\mu\text{m}$ ).

## **II- Culture primaire de cellules de cortex de souriceaux post-nataux P0**

### **II-1- Animaux, prélèvements et microdissection**

Les expériences sont réalisées sur des souriceaux SWISS (Janvier et animalerie INMED, Marseille). Les animaux sont maintenus dans une pièce éclairée 12 heures par jour, à la température de 22°C et disposent d'eau et de nourriture à volonté.

Le prélèvement des cortex a lieu à la naissance des souriceaux. Les souriceaux sont décapités. La dissection du cortex est effectuée à sec. Le cortex est mis dans du milieu de dissection de Hank's.

La dissociation enzymatique du cortex se réalise à l'aide de la papaïne pendant 40 minutes à 37°C. La réaction est arrêtée par remplacement du milieu par du milieu de culture. Les cellules sont individualisées par dissociation mécanique, à l'aide de 3 pipettes pasteur de diamètre décroissant. Les cellules sont ensuiteensemencées à 400000 cellules par P35. Le milieu ne contient ni antibiotique ni antifongique.

Un changement total de milieu est réalisé 24 heures après l'ensemencement des cellules, puis par moitié 9 jours après.

La mise en culture des cellules corticales au jour J0 est réalisée dans du milieu de culture MEM dans des boîtes de Pétri (Nunc, 35 mm de diamètre) préalablement recouvertes de poly-L-lysine (10µg/ml). Les cellules sont maintenues dans un incubateur à 37°C dans une atmosphère humide enrichie en CO<sub>2</sub> (95%air-5%CO<sub>2</sub>).

#### Composition du milieu de dissociation (Hank's balanced modified 9,5g/l ; Sigma H2387):

- Saccharose 300g/l
- Glucose 120 g/l
- NaCl 160 g/l
- KCl 8g/l
- Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,9 g/l
- KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,6 g/l
- Hepes 93,88g/l qsp 1 l H<sub>2</sub>O, ajuster pH à 7,3.

#### Composition du milieu de culture : pour 100ml

- MEM (GIBCO, 51200-046) sans rouge phenol et sans glutamine, 93ml,
- Hi Glucose MEM (10,2 g glucose dans 40 ml MEM), 2 ml,
- Serum supreme (Biowhittaker, 14-492F), 5ml,
- Serum Extender (Becton Dickinson, 355006), 100µl.

## **II-2-Transfection chimique par lipofection**

Les siARN ont été introduits dans les neurones par transfection chimique utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, 11668-027) à J5. Cette technique permet une transfection de 5 à 10% des cellules. Pour pouvoir procéder aux enregistrements électrophysiologiques, une co-transfection des siARN avec le vecteur codant pour CD4, une protéine du système immunitaire situé à la membrane plasmique, permet de repérer les neurones transfectés grâce à sa détection par des anticorps couplés à des billes.

- garder le milieu conditionné des neurones à 37°C à J5
- équilibrer les neurones dans du milieu OPTI-MEM à 37°C pendant 30 minutes
- incuber les acides nucléiques avec la Lipofectamine 2000 pendant 20 minutes
- incuber le mélange avec les neurones pendant 2 heures
- enlever le mélange et remettre le milieu conditionné
- changer la moitié du milieu 6 heures après.

Avant chaque enregistrement, on incube 10 minutes les lamelles dans un milieu mimant le milieu extracellulaire des neurones et contenant des anticorps affins de la protéine CD4 et couplés à des billes.

## **II-3- Transduction virale**

Les transductions virales ont été réalisées grâce à une collaboration avec l'entreprise Vectalys (Toulouse) qui a construit et produit les lentivirus.

Les particules virales sont des vecteurs de type lentivirus titrés entre  $1.10^7$  et  $1.10^9$ . Les aliquots stockés à -80°C sont décongelés sur glace. A noter qu'un cycle de décongélation provoque la destruction et la perte de près de 30% du titre viral.

Les cellules sont transduites au cinquième jour de culture et les particules virales sont directement rajoutées au milieu de culture à MOI 30.

## **II-4- Immunofluorescence indirecte**

Les immunofluorescences indirectes pour la visualisation des mitochondries, respectent le protocole décrit précédemment. Les immunodétections des protéines neuronales suivent le protocole de Pascale Chavis, ci-dessous, appliqué aux cellules ensemencées sur lamelles de verre recouvertes de Poly-L-Lysine.

- laver les lamelles avec du Milieu extracellulaire utilisé en électrophysiologie à 37°C
- incuber avec 3,7% de Formaldéhyde dans du PBS 1X durant 30 minutes à température ambiante
- laver 3 fois 10 minutes par du PBS 1X + Glycine (7,5mg/ml) à température ambiante
- incuber pendant 5 minutes dans du PBS 1X 0,1% Triton X-100
- laver rapidement une fois par du PBS 1X à température ambiante

- incuber 2 x 30 minutes avec du PBS 1X 1% BSA à température ambiante
- incuber toute la nuit à 4°C avec les anticorps primaires dilués dans du PBS 1X 1% BSA
- laver 3 fois pendant 15 minutes dans du PBS 1X 1% BSA
- incuber 1h20 avec les anticorps secondaires dilués dans du PBS 1X 1% BSA
- laver 2 fois pendant 5 minutes dans du PBS 1X 3% sérum de chèvre, 5% BSA et 0,5% Tween-20
- laver 5 fois pendant 10 minutes dans du PBS 1X 1% BSA
- laver 1 fois PBS 1X
- monter les lamelles sur lames avec de l'Aquapolymont (Biovalley).

## II-5- Électrophysiologie

La technique électrophysiologique de Patch Clamp en configuration « cellule entière » a été réalisée à température ambiante dans une chambre d'enregistrement disposée sur un microscope inversé (Leica).

Les neurones sont continuellement perfusés par un **milieu extracellulaire** exempt d'ions magnésium à pH 7,3 et d'osmolarité de 325 mOsm / litre et contenant les éléments suivants (en mM):

- NaCl 160,
- KCl 2,4
- HEPES 10
- glucose 10
- glycine 0,02
- CaCl<sub>2</sub> 1,5.

**Pour les enregistrements des courants excitateurs**, les pipettes de verre de patch (4 à 6 MΩ) ont été remplies avec la **solution intracellulaire** suivante pH 7,3 (osmolarité, 305-310 mOsm / litre ), en mM :

- Cs-méthanesulfonate 144,
- EGTA 1,
- HEPES 10,
- MgCl<sub>2</sub> 4,
- glucose 10
- Na<sub>2</sub>ATP 2
- neurobiotine (1mg/ml)

**Pour les enregistrements des courants inhibiteurs**, les pipettes de verre de patch (4 à 6 MΩ) ont été remplies avec la solution intracellulaire suivante pH 7,3 (osmolarité, 305-310 mOsm / litre ) (en mM)

- KCl 140,
- EGTA 1,
- HEPES 10,

- MgCl<sub>2</sub> 4,
- glucose 10
- Mg<sub>2</sub>ATP 2

Les courants spontanés et miniatures CPSE et CPSI ont été enregistrés à -70 mV.

**Les courants spontanés et miniatures CPSE** ont été isolés en présence de bicuculline (10 µm; Tocris Biosciences par Fisher Bioblock, Illkirch, France), bloquant des récepteurs GABA.

Les courants spontanés NMDA ont été isolés en présence de CNQX (10 µm; Tocris Biosciences), inhibant les canaux AMPA.

Les courants spontanés AMPA ont été isolés en présence de d-APV (25 µm; Tocris Bioscience), inhibant les canaux NMDA.

**Les courants spontanés CPSI (GABA) ont été isolés en présence** de d-APV (25 µm; Tocris Bioscience) et de CNQX (10 µm; Tocris Biosciences par Fisher Bioblock, Illkirch, France).

Les courants miniatures ont été enregistrés dans les mêmes conditions après blocage des canaux sodiques par la TTX (0,3 µm).

Les données ont été acquises en utilisant une Axopatch 200 B et Clampex 8 (Molecular Devices via, DIPSI, Châtillon, France) le logiciel d'acquisition. Les courants ont été filtrés à 2 kHz et numérisés à 5 kHz.

L'amplitude et les intervalles entre les événements CPSE et CPSI ont été analysés avec le logiciel Axograph 4.0 (Molecular Devices via DIPSI) en utilisant un modèle de double-exponentielle:

$$f(t) = \exp(-t/\text{rise}) + \exp(-t/\text{decay})$$





## BIBLIOGRAPHIE

- Acin-Perez, R., Salazar, E., Kamenetsky, M., Buck, J., Levin, L.R., and Manfredi, G. (2009). Cyclic AMP produced inside mitochondria regulates oxidative phosphorylation. *Cell Metab* 9, 265-276.
- Akepati, V.R., Muller, E.C., Otto, A., Strauss, H.M., Portwich, M., and Alexander, C. (2008). Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. *J Neurochem* 106, 372-383.
- Akins, M.R., and Biederer, T. (2006). Cell-cell interactions in synaptogenesis. *Curr Opin Neurobiol* 16, 83-89.
- Alavi, M.V., Bette, S., Schimpf, S., Schuettauf, F., Schraermeyer, U., Wehrl, H.F., Ruttiger, L., Beck, S.C., Tonagel, F., Pichler, B.J., et al. (2007). A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* 130, 1029-1042.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., et al. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26, 211-215.
- Alirol, E., James, D., Huber, D., Marchetto, A., Vergani, L., Martinou, J.C., and Scorrano, L. (2006). The mitochondrial fission protein hFis1 requires the endoplasmic reticulum gateway to induce apoptosis. *Mol Biol Cell* 17, 4593-4605.
- Allen, R.G. (1991). Oxygen-reactive species and antioxidant responses during development: the metabolic paradox of cellular differentiation. *Proc Soc Exp Biol Med* 196, 117-129.
- Amati-Bonneau, P., Guichet, A., Olichon, A., Chevrollier, A., Viala, F., Miot, S., Ayuso, C., Odent, S., Arrouet, C., Verny, C., et al. (2005). OPA1 R445H mutation in optic atrophy associated with sensorineural deafness. *Ann Neurol* 58, 958-963.
- Amati-Bonneau, P., Milea, D., Bonneau, D., Chevrollier, A., Ferre, M., Guillet, V., Gueguen, N., Loiseau, D., de Crescenzo, M.A., Verny, C., et al. (2009). OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1855-1865.
- Amati-Bonneau, P., Odent, S., Derrien, C., Pasquier, L., Malthiery, Y., Reynier, P., and Bonneau, D. (2003). The association of autosomal dominant optic atrophy and moderate deafness may be due to the R445H mutation in the OPA1 gene. *Am J Ophthalmol* 136, 1170-1171.
- Amati-Bonneau, P., Valentino, M.L., Reynier, P., Gallardo, M.E., Bornstein, B., Boissiere, A., Campos, Y., Rivera, H., de la Aleja, J.G., Carroccia, R., et al. (2008). OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* 131, 338-351.
- Ames, A., 3rd (2000). CNS energy metabolism as related to function. *Brain Res Brain Res Rev* 34, 42-68.
- Amiri, M., and Hollenbeck, P.J. (2008). Mitochondrial biogenesis in the axons of vertebrate peripheral neurons. *Dev Neurobiol* 68, 1348-1361.
- Antignani, A., and Youle, R.J. (2007). The cytokine, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), can deliver Bcl-XL as an extracellular fusion protein to protect cells from apoptosis and retain differentiation induction. *J Biol Chem* 282, 11246-11254.
- Aon, M.A., Cortassa, S., Maack, C., and O'Rourke, B. (2007). Sequential opening of mitochondrial ion channels as a function of glutathione redox thiol status. *J Biol Chem* 282, 21889-21900.

- Arnoult, D., Grodet, A., Lee, Y.J., Estaquier, J., and Blackstone, C. (2005a). Release of OPA1 during Apoptosis Participates in the Rapid and Complete Release of Cytochrome c and Subsequent Mitochondrial Fragmentation. *J Biol Chem* 280, 35742-35750.
- Arnoult, D., Rismanchi, N., Grodet, A., Roberts, R.G., Seeburg, D.P., Estaquier, J., Sheng, M., and Blackstone, C. (2005b). Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol* 15, 2112-2118.
- Atkins, C.M., and Sweatt, J.D. (1999). Reactive oxygen species mediate activity-dependent neuron-glia signaling in output fibers of the hippocampus. *J Neurosci* 19, 7241-7248.
- Avshalumov, M.V., Chen, B.T., Marshall, S.P., Pena, D.M., and Rice, M.E. (2003). Glutamate-dependent inhibition of dopamine release in striatum is mediated by a new diffusible messenger, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. *J Neurosci* 23, 2744-2750.
- Avshalumov, M.V., Patel, J.C., and Rice, M.E. (2008). AMPA receptor-dependent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation in striatal medium spiny neurons but not dopamine axons: one source of a retrograde signal that can inhibit dopamine release. *J Neurophysiol* 100, 1590-1601.
- Bach, D., Pich, S., Soriano, F.X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Daugaard, J.R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J.R., et al. (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 278, 17190-17197.
- Baloh, R.H., Schmidt, R.E., Pestronk, A., and Milbrandt, J. (2007). Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* 27, 422-430.
- Banoei, M.M., Houshmand, M., Panahi, M.S., Shariati, P., Rostami, M., Manshadi, M.D., and Majidizadeh, T. (2007). Huntington's disease and mitochondrial DNA deletions: event or regular mechanism for mutant huntingtin protein and CAG repeats expansion?! *Cell Mol Neurobiol* 27, 867-875.
- Barja, G. (1999). Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* 31, 347-366.
- Barrett, W.C., DeGnore, J.P., Keng, Y.F., Zhang, Z.Y., Yim, M.B., and Chock, P.B. (1999). Roles of superoxide radical anion in signal transduction mediated by reversible regulation of protein-tyrosine phosphatase 1B. *J Biol Chem* 274, 34543-34546.
- Barsoum, M.J., Yuan, H., Gerencser, A.A., Liot, G., Kushnareva, Y., Graber, S., Kovacs, I., Lee, W.D., Waggoner, J., Cui, J., et al. (2006). Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *Embo J* 25, 3900-3911.
- Baughman, J.M., Perocchi, F., Girgis, H.S., Plovanich, M., Belcher-Timme, C.A., Sancak, Y., Bao, X.R., Strittmatter, L., Goldberger, O., Bogorad, R.L., et al. (2011). Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* 476, 341-345.
- Baxter, R.V., Ben Othmane, K., Rochelle, J.M., Stajich, J.E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Ben Hamida, M., Bel, S., Stenger, J.E., et al. (2002). Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 30, 21-22.

- Bayol-Denizot, C., Daval, J.L., Netter, P., and Minn, A. (2000). Xenobiotic-mediated production of superoxide by primary cultures of rat cerebral endothelial cells, astrocytes, and neurones. *Biochim Biophys Acta* 1497, 115-126.
- Ben-Ari, Y., and Spitzer, N.C. (2004). Nature and nurture in brain development. *Trends Neurosci* 27, 361.
- Benani, A., Troy, S., Carmona, M.C., Fioramonti, X., Lorsignol, A., Leloup, C., Casteilla, L., and Penicaud, L. (2007). Role for mitochondrial reactive oxygen species in brain lipid sensing: redox regulation of food intake. *Diabetes* 56, 152-160.
- Bender, A., Krishnan, K.J., Morris, C.M., Taylor, G.A., Reeve, A.K., Perry, R.H., Jaros, E., Hersheson, J.S., Betts, J., Klopstock, T., et al. (2006). High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet* 38, 515-517.
- Benit, P., Beugnot, R., Chretien, D., Giurgea, I., De Lonlay-Debeney, P., Issartel, J.P., Corral-Debrinski, M., Kerscher, S., Rustin, P., Rotig, A., et al. (2003). Mutant NDUFB2 subunit of mitochondrial complex I causes early onset hypertrophic cardiomyopathy and encephalopathy. *Hum Mutat* 21, 582-586.
- Berger, K.H., and Yaffe, M.P. (1996). Mitochondrial distribution and inheritance. *Experientia* 52, 1111-1116.
- Bernardi, P., and Petronilli, V. (1996). The permeability transition pore as a mitochondrial calcium release channel: a critical appraisal. *J Bioenerg Biomembr* 28, 131-138.
- Bidoret, C., Ayon, A., Barbour, B., and Casado, M. (2009). Presynaptic NR2A-containing NMDA receptors implement a high-pass filter synaptic plasticity rule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14126-14131.
- Billen, L.P., Kokoski, C.L., Lovell, J.F., Leber, B., and Andrews, D.W. (2008). Bcl-XL inhibits membrane permeabilization by competing with Bax. *PLoS Biol* 6, e147.
- Billups, B., and Forsythe, I.D. (2002). Presynaptic mitochondrial calcium sequestration influences transmission at mammalian central synapses. *J Neurosci* 22, 5840-5847.
- Bindokas, V.P., Jordan, J., Lee, C.C., and Miller, R.J. (1996). Superoxide production in rat hippocampal neurons: selective imaging with hydroethidine. *J Neurosci* 16, 1324-1336.
- Blass, J.P. (2001). Brain metabolism and brain disease: is metabolic deficiency the proximate cause of Alzheimer dementia? *J Neurosci Res* 66, 851-856.
- Blitzer, R.D., Connor, J.H., Brown, G.P., Wong, T., Shenolikar, S., Iyengar, R., and Landau, E.M. (1998). Gating of CaMKII by cAMP-regulated protein phosphatase activity during LTP. *Science* 280, 1940-1942.
- Boesch, P., Ibrahim, N., Dietrich, A., and Lightowers, R.N. (2010). Membrane association of mitochondrial DNA facilitates base excision repair in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Res* 38, 1478-1488.
- Bogdanovic, N., Zilmer, M., Zilmer, K., Rehema, A., and Karelson, E. (2001). The Swedish APP670/671 Alzheimer's disease mutation: the first evidence for strikingly increased oxidative injury in the temporal inferior cortex. *Dement Geriatr Cogn Disord* 12, 364-370.
- Bonhoeffer, T., and Yuste, R. (2002). Spine motility. Phenomenology, mechanisms, and function. *Neuron* 35, 1019-1027.

- Bormann, J. (2000). The 'ABC' of GABA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 21, 16-19.
- Bossy, B., Petrilli, A., Klinglmayr, E., Chen, J., Lutz-Meindl, U., Knott, A.B., Masliah, E., Schwarzenbacher, R., and Bossy-Wetzel, E. (2010). S-Nitrosylation of DRP1 does not affect enzymatic activity and is not specific to Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 20 Suppl 2, S513-526.
- Bossy-Wetzel, E., Petrilli, A., and Knott, A.B. (2008). Mutant huntingtin and mitochondrial dysfunction. *Trends Neurosci* 31, 609-616.
- Bourgeois, J.P. (2005). [Brain synaptogenesis and epigenesis]. *Med Sci (Paris)* 21, 428-433.
- Braschi, E., Zunino, R., and McBride, H.M. (2009). MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep* 10, 748-754.
- Breckenridge, D.G., Stojanovic, M., Marcellus, R.C., and Shore, G.C. (2003). Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* 160, 1115-1127.
- Brennan, A.M., Suh, S.W., Won, S.J., Narasimhan, P., Kauppinen, T.M., Lee, H., Edling, Y., Chan, P.H., and Swanson, R.A. (2009). NADPH oxidase is the primary source of superoxide induced by NMDA receptor activation. *Nat Neurosci* 12, 857-863.
- Brewer, G.J., and Torricelli, J.R. (2007). Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nat Protoc* 2, 1490-1498.
- Brewer, G.J., Torricelli, J.R., Evege, E.K., and Price, P.J. (1993). Optimized survival of hippocampal neurons in B27-supplemented Neurobasal, a new serum-free medium combination. *J Neurosci Res* 35, 567-576.
- Brickley, S.G., Misra, C., Mok, M.H., Mishina, M., and Cull-Candy, S.G. (2003). NR2B and NR2D subunits coassemble in cerebellar Golgi cells to form a distinct NMDA receptor subtype restricted to extrasynaptic sites. *J Neurosci* 23, 4958-4966.
- Brookes, P.S., Yoon, Y., Robotham, J.L., Anders, M.W., and Sheu, S.S. (2004). Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* 287, C817-833.
- Brough, D., Schell, M.J., and Irvine, R.F. (2005). Agonist-induced regulation of mitochondrial and endoplasmic reticulum motility. *Biochem J* 392, 291-297.
- Burdon, R.H. (1995). Superoxide and hydrogen peroxide in relation to mammalian cell proliferation. *Free Radic Biol Med* 18, 775-794.
- Burdon, R.H. (1996). Control of cell proliferation by reactive oxygen species. *Biochem Soc Trans* 24, 1028-1032.
- Bureau, I., and Mulle, C. (1998). Potentiation of GABAergic synaptic transmission by AMPA receptors in mouse cerebellar stellate cells: changes during development. *J Physiol* 509 ( Pt 3), 817-831.
- Burnashev, N. (1996). Calcium permeability of glutamate-gated channels in the central nervous system. *Curr Opin Neurobiol* 6, 311-317.
- Cai, Q., Gerwin, C., and Sheng, Z.H. (2005). Syntabulin-mediated anterograde transport of mitochondria along neuronal processes. *J Cell Biol* 170, 959-969.

- Cai, Y., Singh, B.B., Aslanukov, A., Zhao, H., and Ferreira, P.A. (2001). The docking of kinesins, KIF5B and KIF5C, to Ran-binding protein 2 (RanBP2) is mediated via a novel RanBP2 domain. *J Biol Chem* 276, 41594-41602.
- Calkins, M.J., Johnson, D.A., Townsend, J.A., Vargas, M.R., Dowell, J.A., Williamson, T.P., Kraft, A.D., Lee, J.M., Li, J., and Johnson, J.A. (2009). The Nrf2/ARE pathway as a potential therapeutic target in neurodegenerative disease. *Antioxid Redox Signal* 11, 497-508.
- Canet-Aviles, R.M., Wilson, M.A., Miller, D.W., Ahmad, R., McLendon, C., Bandyopadhyay, S., Baptista, M.J., Ringe, D., Petsko, G.A., and Cookson, M.R. (2004). The Parkinson's disease protein DJ-1 is neuroprotective due to cysteine-sulfinic acid-driven mitochondrial localization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 9103-9108.
- Carelli, V., La Morgia, C., Valentino, M.L., Barboni, P., Ross-Cisneros, F.N., and Sadun, A.A. (2009). Retinal ganglion cell neurodegeneration in mitochondrial inherited disorders. *Biochim Biophys Acta* 1787, 518-528.
- Carelli, V., Rugolo, M., Sgarbi, G., Ghelli, A., Zanna, C., Baracca, A., Lenaz, G., Napoli, E., Martinuzzi, A., and Solaini, G. (2004). Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration. *Biochim Biophys Acta* 1658, 172-179.
- Carriere, A., Fernandez, Y., Rigoulet, M., Penicaud, L., and Casteilla, L. (2003). Inhibition of preadipocyte proliferation by mitochondrial reactive oxygen species. *FEBS Lett* 550, 163-167.
- Carroll, R.C., Beattie, E.C., von Zastrow, M., and Malenka, R.C. (2001). Role of AMPA receptor endocytosis in synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 2, 315-324.
- Carroll, R.C., Lissin, D.V., von Zastrow, M., Nicoll, R.A., and Malenka, R.C. (1999). Rapid redistribution of glutamate receptors contributes to long-term depression in hippocampal cultures. *Nat Neurosci* 2, 454-460.
- Cartoni, R., and Martinou, J.C. (2009). Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp Neurol* 218, 268-273.
- Cassereau, J., Chevrollier, A., Gueguen, N., Malinge, M.C., Letournel, F., Nicolas, G., Richard, L., Ferre, M., Verny, C., Dubas, F., et al. (2009). Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics* 10, 145-150.
- Cassidy-Stone, A., Chipuk, J.E., Ingerman, E., Song, C., Yoo, C., Kuwana, T., Kurth, M.J., Shaw, J.T., Hinshaw, J.E., Green, D.R., et al. (2008). Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell* 14, 193-204.
- Castellani, R., Hirai, K., Aliev, G., Drew, K.L., Nunomura, A., Takeda, A., Cash, A.D., Obrenovich, M.E., Perry, G., and Smith, M.A. (2002). Role of mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *J Neurosci Res* 70, 357-360.
- Cereghetti, G.M., Stangherlin, A., Martins de Brito, O., Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P., and Scorrano, L. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 15803-15808.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628-644.

- Chada, S.R., and Hollenbeck, P.J. (2003). Mitochondrial movement and positioning in axons: the role of growth factor signaling. *J Exp Biol* 206, 1985-1992.
- Chada, S.R., and Hollenbeck, P.J. (2004). Nerve growth factor signaling regulates motility and docking of axonal mitochondria. *Curr Biol* 14, 1272-1276.
- Chang, C.R., and Blackstone, C. (2007a). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 282, 21583-21587.
- Chang, C.R., and Blackstone, C. (2007b). Drp1 phosphorylation and mitochondrial regulation. *EMBO Rep* 8, 1088-1089; author reply 1089-1090.
- Chang, D.T., Honick, A.S., and Reynolds, I.J. (2006). Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons. *J Neurosci* 26, 7035-7045.
- Chang, D.T., and Reynolds, I.J. (2006a). Differences in mitochondrial movement and morphology in young and mature primary cortical neurons in culture. *Neuroscience* 141, 727-736.
- Chang, D.T., and Reynolds, I.J. (2006b). Mitochondrial trafficking and morphology in healthy and injured neurons. *Prog Neurobiol* 80, 241-268.
- Chavis, P., Mollard, P., Bockaert, J., and Manzoni, O. (1998). Visualization of cyclic AMP-regulated presynaptic activity at cerebellar granule cells. *Neuron* 20, 773-781.
- Chavis, P., and Westbrook, G. (2001). Integrins mediate functional pre- and postsynaptic maturation at a hippocampal synapse. *Nature* 411, 317-321.
- Chen, H., Chomyn, A., and Chan, D.C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280, 26185-26192.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160, 189-200.
- Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2007). Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130, 548-562.
- Chen, H., Vermulst, M., Wang, Y.E., Chomyn, A., Prolla, T.A., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2010). Mitochondrial fusion is required for mtDNA stability in skeletal muscle and tolerance of mtDNA mutations. *Cell* 141, 280-289.
- Cheng, X., and Ivessa, A.S. (2010). Association of the yeast DNA helicase Pif1p with mitochondrial membranes and mitochondrial DNA. *Eur J Cell Biol* 89, 742-747.
- Chevrollier, A., Guillet, V., Loiseau, D., Gueguen, N., de Crescenzo, M.A., Verny, C., Ferre, M., Dollfus, H., Odent, S., Milea, D., et al. (2008). Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol* 63, 794-798.
- Chih, B., Engelman, H., and Scheiffele, P. (2005). Control of excitatory and inhibitory synapse formation by neuroligins. *Science* 307, 1324-1328.
- Cho, D.H., Nakamura, T., Fang, J., Cieplak, P., Godzik, A., Gu, Z., and Lipton, S.A. (2009). S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 324, 102-105.

- Choi, S.Y., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J., and Frohman, M.A. (2006). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* 8, 1255-1262.
- Choquet, D., and Triller, A. (2003). The role of receptor diffusion in the organization of the postsynaptic membrane. *Nat Rev Neurosci* 4, 251-265.
- Choubey, V., Safiulina, D., Vaarmann, A., Cagalinec, M., Wareski, P., Kuun, M., Zharkovsky, A., and Kaasik, A. (2011). Mutant A53T alpha-synuclein induces neuronal death by increasing mitochondrial autophagy. *J Biol Chem* 286, 10814-10824.
- Chung, S., Dzeja, P.P., Faustino, R.S., Perez-Terzic, C., Behfar, A., and Terzic, A. (2007). Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4 Suppl 1, S60-67.
- Cipolat, S., de Brito, O.M., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15927-15932.
- Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., et al. (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 126, 163-175.
- Cohn, A.C., Toomes, C., Hewitt, A.W., Kearns, L.S., Inglehearn, C.F., Craig, J.E., and Mackey, D.A. (2008). The natural history of OPA1-related autosomal dominant optic atrophy. *Br J Ophthalmol* 92, 1333-1336.
- Cohn, A.C., Toomes, C., Potter, C., Towns, K.V., Hewitt, A.W., Inglehearn, C.F., Craig, J.E., and Mackey, D.A. (2007). Autosomal dominant optic atrophy: penetrance and expressivity in patients with OPA1 mutations. *Am J Ophthalmol* 143, 656-662.
- Collins, T.J., Berridge, M.J., Lipp, P., and Bootman, M.D. (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *Embo J* 21, 1616-1627.
- Contractor, A., Mulle, C., and Swanson, G.T. (2011). Kainate receptors coming of age: milestones of two decades of research. *Trends Neurosci* 34, 154-163.
- Contractor, A., Rogers, C., Maron, C., Henkemeyer, M., Swanson, G.T., and Heinemann, S.F. (2002). Trans-synaptic Eph receptor-ephrin signaling in hippocampal mossy fiber LTP. *Science* 296, 1864-1869.
- Contractor, A., Swanson, G., and Heinemann, S.F. (2001). Kainate receptors are involved in short- and long-term plasticity at mossy fiber synapses in the hippocampus. *Neuron* 29, 209-216.
- Coskun, P.E., Beal, M.F., and Wallace, D.C. (2004). Alzheimer's brains harbor somatic mtDNA control-region mutations that suppress mitochondrial transcription and replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 10726-10731.
- Costa, V., Giacomello, M., Hudec, R., Lopreiato, R., Ermak, G., Lim, D., Malorni, W., Davies, K.J., Carafoli, E., and Scorrano, L. (2010). Mitochondrial fission and cristae disruption increase the response of cell models of Huntington's disease to apoptotic stimuli. *EMBO Mol Med* 2, 490-503.
- Coutinho, V., and Knopfel, T. (2002). Metabotropic glutamate receptors: electrical and chemical signaling properties. *Neuroscientist* 8, 551-561.

- Cribbs, J.T., and Strack, S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* 8, 939-944.
- Cross, A.R., and Jones, O.T. (1991). Enzymic mechanisms of superoxide production. *Biochim Biophys Acta* 1057, 281-298.
- Crouch, P.J., Blake, R., Duce, J.A., Ciccotosto, G.D., Li, Q.X., Barnham, K.J., Curtain, C.C., Cherny, R.A., Cappai, R., Dyrks, T., et al. (2005). Copper-dependent inhibition of human cytochrome c oxidase by a dimeric conformer of amyloid-beta1-42. *J Neurosci* 25, 672-679.
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., Garcia-Planells, J., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marin, I., Vilchez, J.J., and Palau, F. (2002). The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 30, 22-25.
- Da Cruz, S., Parone, P.A., Gonzalo, P., Bienvenut, W.V., Tondera, D., Jourdain, A., Quadroni, M., and Martinou, J.C. (2008). SLP-2 interacts with prohibitins in the mitochondrial inner membrane and contributes to their stability. *Biochim Biophys Acta* 1783, 904-911.
- Dagda, R.K., Gusdon, A.M., Pien, I., Strack, S., Green, S., Li, C., Van Houten, B., Cherra, S.J., 3rd, and Chu, C.T. (2011). Mitochondrially localized PKA reverses mitochondrial pathology and dysfunction in a cellular model of Parkinson's disease. *Cell Death Differ*.
- Darshi, M., Mendiola, V.L., Mackey, M.R., Murphy, A.N., Koller, A., Perkins, G.A., Ellisman, M.H., and Taylor, S.S. (2010). ChChd3, an Inner Mitochondrial Membrane Protein, Is Essential for Maintaining Crista Integrity and Mitochondrial Function. *J Biol Chem* 286, 2918-2932.
- Davey, G.P., Peuchen, S., and Clark, J.B. (1998). Energy thresholds in brain mitochondria. Potential involvement in neurodegeneration. *J Biol Chem* 273, 12753-12757.
- Davies, S.W., Turmaine, M., Cozens, B.A., DiFiglia, M., Sharp, A.H., Ross, C.A., Scherzinger, E., Wanker, E.E., Mangiarini, L., and Bates, G.P. (1997). Formation of neuronal intranuclear inclusions underlies the neurological dysfunction in mice transgenic for the HD mutation. *Cell* 90, 537-548.
- Davies, V.J., Hollins, A.J., Piechota, M.J., Yip, W., Davies, J.R., White, K.E., Nicols, P.P., Boulton, M.E., and Votruba, M. (2007). Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum Mol Genet* 16, 1307-1318.
- de Brito, O.M., and Scorrano, L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605-610.
- De Palma, C., Falcone, S., Pisoni, S., Cipolat, S., Panzeri, C., Pambianco, S., Pisconti, A., Allevi, R., Bassi, M.T., Cossu, G., et al. (2010). Nitric oxide inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission is critical for myogenic differentiation. *Cell Death Differ* 17, 1684-1696.
- De Rasmio, D., Palmisano, G., Scacco, S., Technikova-Dobrova, Z., Panelli, D., Cocco, T., Sardanelli, A.M., Gnani, A., Micelli, L., Trani, A., et al. (2010). Phosphorylation pattern of the NDUFS4 subunit of complex I of the mammalian respiratory chain. *Mitochondrion* 10, 464-471.
- De Vos, K.J., Allan, V.J., Grierson, A.J., and Sheetz, M.P. (2005). Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr Biol* 15, 678-683.

- Dean, C., and Dresbach, T. (2006). Neuroligins and neuexins: linking cell adhesion, synapse formation and cognitive function. *Trends Neurosci* 29, 21-29.
- Deas, E., Plun-Favreau, H., Gandhi, S., Desmond, H., Kjaer, S., Loh, S.H., Renton, A.E., Harvey, R.J., Whitworth, A.J., Martins, L.M., et al. (2011). PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Hum Mol Genet* 20, 867-879.
- Del Roso, A., Vittorini, S., Cavallini, G., Donati, A., Gori, Z., Masini, M., Pollera, M., and Bergamini, E. (2003). Ageing-related changes in the in vivo function of rat liver macroautophagy and proteolysis. *Exp Gerontol* 38, 519-527.
- Delettre, C., Griffoin, J.M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P., and Hamel, C.P. (2001). Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Human Genetics* 109, 584-591.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., et al. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26, 207-210.
- Delivani, P., Adrain, C., Taylor, R.C., Duriez, P.J., and Martin, S.J. (2006). Role for CED-9 and Egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics. *Mol Cell* 21, 761-773.
- Deng, H., Dodson, M.W., Huang, H., and Guo, M. (2008). The Parkinson's disease genes pink1 and parkin promote mitochondrial fission and/or inhibit fusion in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 14503-14508.
- Denton, R.M., and McCormack, J.G. (1980). The role of calcium in the regulation of mitochondrial metabolism. *Biochem Soc Trans* 8, 266-268.
- Denu, J.M., and Tanner, K.G. (1998). Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. *Biochemistry* 37, 5633-5642.
- Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 870-879.
- Detmer, S.A., Vande Velde, C., Cleveland, D.W., and Chan, D.C. (2008). Hindlimb gait defects due to motor axon loss and reduced distal muscles in a transgenic mouse model of Charcot-Marie-Tooth type 2A. *Hum Mol Genet* 17, 367-375.
- Devi, L., Prabhu, B.M., Galati, D.F., Avadhani, N.G., and Anandatheerthavarada, H.K. (2006). Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci* 26, 9057-9068.
- DiFiglia, M., Sapp, E., Chase, K.O., Davies, S.W., Bates, G.P., Vonsattel, J.P., and Aronin, N. (1997). Aggregation of huntingtin in neuronal intranuclear inclusions and dystrophic neurites in brain. *Science* 277, 1990-1993.
- Diot, A., Guillou, E., Daloyau, M., Arnaune-Pelloquin, L., Emorine, L.J., and Belenguer, P. (2009). Transmembrane segments of the dynamin Msp1p uncouple its functions in the control of mitochondrial morphology and genome maintenance. *J Cell Sci* 122, 2632-2639.
- Dittman, J.S., Kreitzer, A.C., and Regehr, W.G. (2000). Interplay between facilitation, depression, and residual calcium at three presynaptic terminals. *J Neurosci* 20, 1374-1385.

- Droge, W. (2002). Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.
- Duchen, M.R. (1992). Ca(2+)-dependent changes in the mitochondrial energetics in single dissociated mouse sensory neurons. *Biochem J* 283 ( Pt 1), 41-50.
- Duchen, M.R. (2000). Mitochondria and Ca(2+) in cell physiology and pathophysiology. *Cell Calcium* 28, 339-348.
- Dudek, S.M., and Bear, M.F. (1992). Homosynaptic long-term depression in area CA1 of hippocampus and effects of N-methyl-D-aspartate receptor blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 4363-4367.
- Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., Bauer, M.F., Attardi, G., Larsson, N.G., et al. (2006). Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 281, 37972-37979.
- Duvezin-Caubet, S., Koppen, M., Wagener, J., Zick, M., Israel, L., Bernacchia, A., Jagasia, R., Rugarli, E.I., Imhof, A., Neupert, W., et al. (2007). OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Biol Cell* 18, 3582-3590.
- Echegoyen, J., Neu, A., Graber, K.D., and Soltesz, I. (2007). Homeostatic plasticity studied using in vivo hippocampal activity-blockade: synaptic scaling, intrinsic plasticity and age-dependence. *PLoS One* 2, e700.
- Ehse, S., Raschke, I., Mancuso, G., Bernacchia, A., Geimer, S., Tondera, D., Martinou, J.C., Westermann, B., Rugarli, E.I., and Langer, T. (2009). Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol* 187, 1023-1036.
- Elachouri, G., Vidoni, S., Zanna, C., Pattyn, A., Boukhaddaoui, H., Gaget, K., Yu-Wai-Man, P., Gasparre, G., Sarzi, E., Delettre, C., et al. (2010). OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res*.
- Erecinska, M., Nelson, D., and Silver, I.A. (1996). Metabolic and energetic properties of isolated nerve ending particles (synaptosomes). *Biochim Biophys Acta* 1277, 13-34.
- Estaquier, J., and Arnoult, D. (2007). Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ* 14, 1086-1094.
- Eura, Y., Ishihara, N., Oka, T., and Mihara, K. (2006). Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *J Cell Sci* 119, 4913-4925.
- Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S., and Mihara, K. (2003). Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem (Tokyo)* 134, 333-344.
- Ferraris, S., Clark, S., Garelli, E., Davidzon, G., Moore, S.A., Kardon, R.H., Bienstock, R.J., Longley, M.J., Mancuso, M., Gutierrez Rios, P., et al. (2008). Progressive external ophthalmoplegia and vision and hearing loss in a patient with mutations in POLG2 and OPA1. *Arch Neurol* 65, 125-131.
- Ferre, M., Amati-Bonneau, P., Tourmen, Y., Malthiery, Y., and Reynier, P. (2005). eOPA1: an online database for OPA1 mutations. *Hum Mutat* 25, 423-428.

- Ferre, M., Bonneau, D., Milea, D., Chevrollier, A., Verny, C., Dollfus, H., Ayuso, C., Defoort, S., Vignal, C., Zanlonghi, X., et al. (2009). Molecular screening of 980 cases of suspected hereditary optic neuropathy with a report on 77 novel OPA1 mutations. *Hum Mutat* 30, E692-705.
- Fiala, J.C., Feinberg, M., Popov, V., and Harris, K.M. (1998). Synaptogenesis via dendritic filopodia in developing hippocampal area CA1. *J Neurosci* 18, 8900-8911.
- Fiskum, G., Murphy, A.N., and Beal, M.F. (1999). Mitochondria in neurodegeneration: acute ischemia and chronic neurodegenerative diseases. *J Cereb Blood Flow Metab* 19, 351-369.
- Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1, 515-525.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., et al. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126, 177-189.
- Frieden, M., James, D., Castelbou, C., Danckaert, A., Martinou, J.C., and Demaurex, N. (2004). Ca(2+) homeostasis during mitochondrial fragmentation and perinuclear clustering induced by hFis1. *J Biol Chem* 279, 22704-22714.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., Dibenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science*.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W., and Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol* 152, 683-692.
- Fujita, T., Maturana, A.D., Ikuta, J., Hamada, J., Walchli, S., Suzuki, T., Sawa, H., Wooten, M.W., Okajima, T., Tatematsu, K., et al. (2007). Axonal guidance protein FEZ1 associates with tubulin and kinesin motor protein to transport mitochondria in neurites of NGF-stimulated PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 361, 605-610.
- Fukushima, N.H., Brisch, E., Keegan, B.R., Bleazard, W., and Shaw, J.M. (2001). The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 12, 2756-2766.
- Futai, K., Kim, M.J., Hashikawa, T., Scheiffele, P., Sheng, M., and Hayashi, Y. (2007). Retrograde modulation of presynaptic release probability through signaling mediated by PSD-95-neurologin. *Nat Neurosci* 10, 186-195.
- Gabaldon, T., and Huynen, M.A. (2004). Shaping the mitochondrial proteome. *Biochim Biophys Acta* 1659, 212-220.
- Galinier, A., Carriere, A., Fernandez, Y., Carpene, C., Andre, M., Caspar-Bauguil, S., Thouvenot, J.P., Periquet, B., Penicaud, L., and Casteilla, L. (2006). Adipose tissue proadipogenic redox changes in obesity. *J Biol Chem* 281, 12682-12687.
- Garrido, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., van der Bliek, A.M., and Spelbrink, J.N. (2003). Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell* 14, 1583-1596.
- Gegg, M.E., Cooper, J.M., Schapira, A.H., and Taanman, J.W. (2009). Silencing of PINK1 expression affects mitochondrial DNA and oxidative phosphorylation in dopaminergic cells. *PLoS One* 4, e4756.

- Gegg, M.E., and Schapira, A.H. (2011). PINK1-parkin-dependent mitophagy involves ubiquitination of mitofusins 1 and 2: Implications for Parkinson disease pathogenesis. *Autophagy* 7, 243-245.
- Gerencser, A.A., and Adam-Vizi, V. (2005). Mitochondrial Ca<sup>2+</sup> dynamics reveals limited intramitochondrial Ca<sup>2+</sup> diffusion. *Biophys J* 88, 698-714.
- Gibson, G.E., Sheu, K.F., and Blass, J.P. (1998). Abnormalities of mitochondrial enzymes in Alzheimer disease. *J Neural Transm* 105, 855-870.
- Glater, E.E., Megeath, L.J., Stowers, R.S., and Schwarz, T.L. (2006). Axonal transport of mitochondria requires mltin to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* 173, 545-557.
- Gleason, C., Huang, S., Thatcher, L.F., Foley, R.C., Anderson, C.R., Carroll, A.J., Millar, A.H., and Singh, K.B. (2011). Mitochondrial complex II has a key role in mitochondrial-derived reactive oxygen species influence on plant stress gene regulation and defense. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 10768-10773.
- Gomes, L.C., Di Benedetto, G., and Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* 13, 589-598.
- Gomez, L.L., Alam, S., Smith, K.E., Horne, E., and Dell'Acqua, M.L. (2002). Regulation of A-kinase anchoring protein 79/150-cAMP-dependent protein kinase postsynaptic targeting by NMDA receptor activation of calcineurin and remodeling of dendritic actin. *J Neurosci* 22, 7027-7044.
- Greenfield, J.P., Xu, H., Greengard, P., Gandy, S., and Seeger, M. (1999). Generation of the amyloid-beta peptide N terminus in *Saccharomyces cerevisiae* expressing human Alzheimer's amyloid-beta precursor protein. *J Biol Chem* 274, 33843-33846.
- Grimm, S., and Brdiczka, D. (2007). The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 12, 841-855.
- Griparic, L., Kanazawa, T., and van der Blik, A.M. (2007). Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* 178, 757-764.
- Griparic, L., van der Wel, N.N., Orozco, I.J., Peters, P.J., and van der Blik, A.M. (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem* 279, 18792-18798.
- Gu, M., Gash, M.T., Mann, V.M., Javoy-Agid, F., Cooper, J.M., and Schapira, A.H. (1996). Mitochondrial defect in Huntington's disease caudate nucleus. *Ann Neurol* 39, 385-389.
- Guan, K., Farh, L., Marshall, T.K., and Deschenes, R.J. (1993). Normal mitochondrial structure and genome maintenance in yeast requires the dynamine-like product of the MGM1 gene. *Curr Genet* 24, 141-148.
- Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombes, A., Belenguer, P., Arnoult, D., and Rojo, M. (2008). Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* 100, 315-325.
- Guillou, E., Bousquet, C., Daloyau, M., Emorine, L.J., and Belenguer, P. (2005). Msp1p is an intermembrane space dynamine-related protein that mediates mitochondrial fusion in a Dnm1p-dependent manner in *S. pombe*. *FEBS Lett* 579, 1109-1116.

- Guo, X., Macleod, G.T., Wellington, A., Hu, F., Panchumarthi, S., Schoenfield, M., Marin, L., Charlton, M.P., Atwood, H.L., and Zinsmaier, K.E. (2005). The GTPase dMiro is required for axonal transport of mitochondria to *Drosophila* synapses. *Neuron* 47, 379-393.
- Gurskaya, N.G., Verkhusha, V.V., Shcheglov, A.S., Staroverov, D.B., Chepurnykh, T.V., Fradkov, A.F., Lukyanov, S., and Lukyanov, K.A. (2006). Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. *Nat Biotechnol* 24, 461-465.
- Guyton, K.Z., Liu, Y., Gorospe, M., Xu, Q., and Holbrook, N.J. (1996). Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J Biol Chem* 271, 4138-4142.
- Guzy, R.D., Sharma, B., Bell, E., Chandel, N.S., and Schumacker, P.T. (2008). Loss of the SdhB, but Not the SdhA, subunit of complex II triggers reactive oxygen species-dependent hypoxia-inducible factor activation and tumorigenesis. *Mol Cell Biol* 28, 718-731.
- Hajek, P., Chomyn, A., and Attardi, G. (2007). Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2. *J Biol Chem* 282, 5670-5681.
- Halestrap, A.P., and Pasdois, P. (2009). The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 1787, 1402-1415.
- Hall, B.J., Ripley, B., and Ghosh, A. (2007). NR2B signaling regulates the development of synaptic AMPA receptor current. *J Neurosci* 27, 13446-13456.
- Han, X.J., Lu, Y.F., Li, S.A., Kaitsuka, T., Sato, Y., Tomizawa, K., Nairn, A.C., Takei, K., Matsui, H., and Matsushita, M. (2008). CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 182, 573-585.
- Hansford, R.G., Moreno-Sanchez, R., and Lewartowski, B. (1989). Activation of pyruvate dehydrogenase complex by Ca<sup>2+</sup> in intact heart, cardiac myocytes, and cardiac mitochondria. *Ann N Y Acad Sci* 573, 240-253.
- Hansford, R.G., and Zorov, D. (1998). Role of mitochondrial calcium transport in the control of substrate oxidation. *Mol Cell Biochem* 184, 359-369.
- Hansson, C.A., Frykman, S., Farmery, M.R., Tjernberg, L.O., Nilsberth, C., Pursglove, S.E., Ito, A., Winblad, B., Cowburn, R.F., Thyberg, J., et al. (2004). Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active gamma-secretase complexes in mitochondria. *J Biol Chem* 279, 51654-51660.
- Hansson Petersen, C.A., Alikhani, N., Behbahani, H., Wiehager, B., Pavlov, P.F., Alafuzoff, I., Leinonen, V., Ito, A., Winblad, B., Glaser, E., et al. (2008). The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 13145-13150.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., et al. (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* 441, 885-889.
- Harder, Z., Zunino, R., and McBride, H. (2004). Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol* 14, 340-345.
- Harris, A.Z., and Pettit, D.L. (2007). Extrasynaptic and synaptic NMDA receptors form stable and uniform pools in rat hippocampal slices. *J Physiol* 584, 509-519.
- Harris, E.W., Ganong, A.H., and Cotman, C.W. (1984). Long-term potentiation in the hippocampus involves activation of N-methyl-D-aspartate receptors. *Brain Res* 323, 132-137.

- Hartman, K.N., Pal, S.K., Burrone, J., and Murthy, V.N. (2006). Activity-dependent regulation of inhibitory synaptic transmission in hippocampal neurons. *Nat Neurosci* 9, 642-649.
- Hayashi, T., Ishimori, C., Takahashi-Niki, K., Taira, T., Kim, Y.C., Maita, H., Maita, C., Ariga, H., and Iguchi-Ariga, S.M. (2009). DJ-1 binds to mitochondrial complex I and maintains its activity. *Biochem Biophys Res Commun* 390, 667-672.
- Heiduschka, P., Schnichels, S., Fuhrmann, N., Hofmeister, S., Schraermeyer, U., Wissinger, B., and Alavi, M.V. Electrophysiological and histologic assessment of retinal ganglion cell fate in a mouse model for OPA1-associated autosomal dominant optic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 51, 1424-1431.
- Helbock, H.J., Beckman, K.B., and Ames, B.N. (1999). 8-Hydroxydeoxyguanosine and 8-hydroxyguanine as biomarkers of oxidative DNA damage. *Methods Enzymol* 300, 156-166.
- Hennou, S., Khalilov, I., Diabira, D., Ben-Ari, Y., and Gozlan, H. (2002). Early sequential formation of functional GABA(A) and glutamatergic synapses on CA1 interneurons of the rat foetal hippocampus. *Eur J Neurosci* 16, 197-208.
- Hermann, G.J., and Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol* 14, 265-303.
- Hermann, G.J., Thatcher, J.W., Mills, J.P., Hales, K.G., Fuller, M.T., Nunnari, J., and Shaw, J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* 143, 359-373.
- Hickman, J.A., Hardwick, J.M., Kaczmarek, L.K., and Jonas, E.A. (2008). Bcl-xL inhibitor ABT-737 reveals a dual role for Bcl-xL in synaptic transmission. *J Neurophysiol* 99, 1515-1522.
- Hirokawa, N., and Takemura, R. (2005). Molecular motors and mechanisms of directional transport in neurons. *Nat Rev Neurosci* 6, 201-214.
- Hochmuth, C.E., Biteau, B., Bohmann, D., and Jasper, H. (2011). Redox regulation by Keap1 and Nrf2 controls intestinal stem cell proliferation in *Drosophila*. *Cell Stem Cell* 8, 188-199.
- Hollenbeck, P.J. (1993). Products of endocytosis and autophagy are retrieved from axons by regulated retrograde organelle transport. *J Cell Biol* 121, 305-315.
- Hollenbeck, P.J. (2005). Mitochondria and neurotransmission: evacuating the synapse. *Neuron* 47, 331-333.
- Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118, 5411-5419.
- Hom, J.R., Gewandter, J.S., Michael, L., Sheu, S.S., and Yoon, Y. (2007). Thapsigargin induces biphasic fragmentation of mitochondria through calcium-mediated mitochondrial fission and apoptosis. *J Cell Physiol* 212, 498-508.
- Hoppins, S., and Nunnari, J. (2009). The molecular mechanism of mitochondrial fusion. *Biochim Biophys Acta* 1793, 20-26.
- Horton, T.M., Graham, B.H., Corral-Debrinski, M., Shoffner, J.M., Kaufman, A.E., Beal, M.F., and Wallace, D.C. (1995). Marked increase in mitochondrial DNA deletion levels in the cerebral cortex of Huntington's disease patients. *Neurology* 45, 1879-1883.

- Hoth, M., Button, D.C., and Lewis, R.S. (2000). Mitochondrial control of calcium-channel gating: a mechanism for sustained signaling and transcriptional activation in T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10607-10612.
- Hoth, M., Fanger, C.M., and Lewis, R.S. (1997). Mitochondrial regulation of store-operated calcium signaling in T lymphocytes. *J Cell Biol* 137, 633-648.
- Hsu, Y.T., Wolter, K.G., and Youle, R.J. (1997). Cytosol-to-membrane redistribution of Bax and Bcl-X(L) during apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 3668-3672.
- Hu, R., Saw, C.L., Yu, R., and Kong, A.N. (2010). Regulation of NF-E2-related factor 2 signaling for cancer chemoprevention: antioxidant coupled with antiinflammatory. *Antioxid Redox Signal* 13, 1679-1698.
- Hua, J.Y., Smear, M.C., Baier, H., and Smith, S.J. (2005). Regulation of axon growth in vivo by activity-based competition. *Nature* 434, 1022-1026.
- Hudson, G., Amati-Bonneau, P., Blakely, E.L., Stewart, J.D., He, L., Schaefer, A.M., Griffiths, P.G., Ahlqvist, K., Suomalainen, A., Reynier, P., et al. (2008). Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 131, 329-337.
- Ibi, M., Katsuyama, M., Fan, C., Iwata, K., Nishinaka, T., Yokoyama, T., and Yabe-Nishimura, C. (2006). NOX1/NADPH oxidase negatively regulates nerve growth factor-induced neurite outgrowth. *Free Radic Biol Med* 40, 1785-1795.
- Ichas, F., Jouaville, L.S., and Mazat, J.P. (1997). Mitochondria are excitable organelles capable of generating and conveying electrical and calcium signals. *Cell* 89, 1145-1153.
- Ikuta, J., Maturana, A., Fujita, T., Okajima, T., Tatematsu, K., Tanizawa, K., and Kuroda, S. (2007). Fasciculation and elongation protein zeta-1 (FEZ1) participates in the polarization of hippocampal neuron by controlling the mitochondrial motility. *Biochem Biophys Res Commun* 353, 127-132.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., and Nunnari, J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170, 1021-1027.
- Irrcher, I., Aleyasin, H., Seifert, E.L., Hewitt, S.J., Chhabra, S., Phillips, M., Lutz, A.K., Rousseaux, M.W., Bevilacqua, L., Jahani-Asl, A., et al. (2010). Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics. *Hum Mol Genet* 19, 3734-3746.
- Ishihara, N., Eura, Y., and Mihara, K. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* 117, 6535-6546.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., and Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *Embo J* 25, 2966-2977.
- Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S.O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y., et al. (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol* 11, 958-966.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., et al. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431, 997-1002.
- Itoh, K., Chiba, T., Takahashi, S., Ishii, T., Igarashi, K., Katoh, Y., Oyake, T., Hayashi, N., Satoh, K., Hatayama, I., et al. (1997). An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction

of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem Biophys Res Commun* 236, 313-322.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., Igarashi, K., Engel, J.D., and Yamamoto, M. (1999). Keap1 represses nuclear activation of antioxidant responsive elements by Nrf2 through binding to the amino-terminal Neh2 domain. *Genes Dev* 13, 76-86.

Itoh, K., Wakabayashi, N., Katoh, Y., Ishii, T., O'Connor, T., and Yamamoto, M. (2003). Keap1 regulates both cytoplasmic-nuclear shuttling and degradation of Nrf2 in response to electrophiles. *Genes Cells* 8, 379-391.

Jackson, A.C., and Nicoll, R.A. (2011). The expanding social network of ionotropic glutamate receptors: TARPs and other transmembrane auxiliary subunits. *Neuron* 70, 178-199.

Jahani-Asl, A., Pilon-Larose, K., Xu, W., MacLaurin, J.G., Park, D.S., McBride, H.M., and Slack, R.S. (2011). The mitochondrial inner membrane GTPase, optic atrophy 1 (Opa1), restores mitochondrial morphology and promotes neuronal survival following excitotoxicity. *J Biol Chem* 286, 4772-4782.

Jain, A.K., Bloom, D.A., and Jaiswal, A.K. (2005). Nuclear import and export signals in control of Nrf2. *J Biol Chem* 280, 29158-29168.

Jakobs, S., Martini, N., Schauss, A.C., Egner, A., Westermann, B., and Hell, S.W. (2003). Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J Cell Sci* 116, 2005-2014.

James, D.I., Parone, P.A., Mattenberger, Y., and Martinou, J.C. (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 278, 36373-36379.

Jenkins, B.G., Andreassen, O.A., Dedeoglu, A., Leavitt, B., Hayden, M., Borchelt, D., Ross, C.A., Ferrante, R.J., and Beal, M.F. (2005). Effects of CAG repeat length, HTT protein length and protein context on cerebral metabolism measured using magnetic resonance spectroscopy in transgenic mouse models of Huntington's disease. *J Neurochem* 95, 553-562.

Jiang, D., Zhao, L., and Clapham, D.E. (2009). Genome-wide RNAi screen identifies Letm1 as a mitochondrial Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter. *Science* 326, 144-147.

Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P., and Youle, R.J. (2010). Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL. *J Cell Biol* 191, 933-942.

Jofuku, A., Ishihara, N., and Mihara, K. (2005). Analysis of functional domains of rat mitochondrial Fis1, the mitochondrial fission-stimulating protein. *Biochem Biophys Res Commun* 333, 650-659.

Jones, B.A., and Fangman, W.L. (1992). Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev* 6, 380-389.

Jouaville, L.S., Ichas, F., Holmuhamedov, E.L., Camacho, P., and Lechleiter, J.D. (1995). Synchronization of calcium waves by mitochondrial substrates in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature* 377, 438-441.

Jung, D.W., Baysal, K., and Brierley, G.P. (1995). The sodium-calcium antiport of heart mitochondria is not electroneutral. *J Biol Chem* 270, 672-678.

- Kagan, V.E., Tyurina, Y.Y., Bayir, H., Chu, C.T., Kapralov, A.A., Vlasova, I., Belikova, N.A., Tyurin, V.A., Amoscato, A., Epperly, M., et al. (2006). The "pro-apoptotic genes" get out of mitochondria: oxidative lipidomics and redox activity of cytochrome c/cardiolipin complexes. *Chem Biol Interact* 163, 15-28.
- Kamei, S., Chen-Kuo-Chang, M., Cazevielle, C., Lenaers, G., Olichon, A., Belenguer, P., Roussignol, G., Renard, N., Eybalin, M., Michelin, A., et al. (2005). Expression of the opa1 mitochondrial protein in retinal ganglion cells: its downregulation causes aggregation of the mitochondrial network. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46, 4288-4294.
- Kamp, F., Exner, N., Lutz, A.K., Wender, N., Hegermann, J., Brunner, B., Nuscher, B., Bartels, T., Giese, A., Beyer, K., et al. (2010). Inhibition of mitochondrial fusion by alpha-synuclein is rescued by PINK1, Parkin and DJ-1. *EMBO J* 29, 3571-3589.
- Kanazawa, T., Zappaterra, M.D., Hasegawa, A., Wright, A.P., Newman-Smith, E.D., Buttle, K.F., McDonald, K., Mannella, C.A., and van der Bliek, A.M. (2008). The *C. elegans* Opa1 homologue EAT-3 is essential for resistance to free radicals. *PLoS Genet* 4, e1000022.
- Kang, M.I., Kobayashi, A., Wakabayashi, N., Kim, S.G., and Yamamoto, M. (2004). Scaffolding of Keap1 to the actin cytoskeleton controls the function of Nrf2 as key regulator of cytoprotective phase 2 genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 2046-2051.
- Kann, O., and Kovacs, R. (2007). Mitochondria and neuronal activity. *Am J Physiol Cell Physiol* 292, C641-657.
- Kann, O., Kovacs, R., and Heinemann, U. (2003). Metabotropic receptor-mediated Ca<sup>2+</sup> signaling elevates mitochondrial Ca<sup>2+</sup> and stimulates oxidative metabolism in hippocampal slice cultures. *J Neurophysiol* 90, 613-621.
- Karbowski, M., Arnoult, D., Chen, H., Chan, D.C., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2004a). Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol* 164, 493-499.
- Karbowski, M., Jeong, S.Y., and Youle, R.J. (2004b). Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 166, 1027-1039.
- Karbowski, M., Lee, Y.J., Gaume, B., Jeong, S.Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* 159, 931-938.
- Karbowski, M., Neutzner, A., and Youle, R.J. (2007). The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol* 178, 71-84.
- Kauer, J.A., and Malenka, R.C. (2007). Synaptic plasticity and addiction. *Nat Rev Neurosci* 8, 844-858.
- Kennedy, M.B. (2000). Signal-processing machines at the postsynaptic density. *Science* 290, 750-754.
- Kensler, T.W., Wakabayashi, N., and Biswal, S. (2007). Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2-ARE pathway. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 47, 89-116.
- Kilinc, D., Peyrin, J.M., Soubeyre, V., Magnifico, S., Saias, L., Viovy, J.L., and Brugg, B. (2011). Wallerian-like degeneration of central neurons after synchronized and geometrically registered mass axotomy in a three-compartmental microfluidic chip. *Neurotox Res* 19, 149-161.

- Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5, 771-781.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J.J. (2007). Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* 462, 245-253.
- Kim, J., Moody, J.P., Edgerly, C.K., Bordiuk, O.L., Cormier, K., Smith, K., Beal, M.F., and Ferrante, R.J. (2010). Mitochondrial loss, dysfunction and altered dynamics in Huntington's disease. *Hum Mol Genet* 19, 3919-3935.
- Kim, J.Y., Hwang, J.M., Ko, H.S., Seong, M.W., Park, B.J., and Park, S.S. (2005). Mitochondrial DNA content is decreased in autosomal dominant optic atrophy. *Neurology* 64, 966-972.
- Kirichok, Y., Krapivinsky, G., and Clapham, D.E. (2004). The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* 427, 360-364.
- Kjer, B., Eiberg, H., Kjer, P., and Rosenberg, T. (1996). Dominant optic atrophy mapped to chromosome 3q region. II. Clinical and epidemiological aspects. *Acta Ophthalmol Scand* 74, 3-7.
- Klann, E., Roberson, E.D., Knapp, L.T., and Sweatt, J.D. (1998). A role for superoxide in protein kinase C activation and induction of long-term potentiation. *J Biol Chem* 273, 4516-4522.
- Koch, A., Thiemann, M., Grabenbauer, M., Yoon, Y., McNiven, M.A., and Schrader, M. (2003). Dynamin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem* 278, 8597-8605.
- Koch, A., Yoon, Y., Bonekamp, N.A., McNiven, M.A., and Schrader, M. (2005). A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16, 5077-5086.
- Kosaka, K., Mimura, J., Itoh, K., Satoh, T., Shimojo, Y., Kitajima, C., Maruyama, A., Yamamoto, M., and Shirasawa, T. (2010). Role of Nrf2 and p62/ZIP in the neurite outgrowth by carnitine in PC12h cells. *J Biochem* 147, 73-81.
- Koshihara, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305, 858-862.
- Kovtun, I.V., Liu, Y., Bjoras, M., Klungland, A., Wilson, S.H., and McMurray, C.T. (2007). OGG1 initiates age-dependent CAG trinucleotide expansion in somatic cells. *Nature* 447, 447-452.
- Kraytsberg, Y., Kudryavtseva, E., McKee, A.C., Geula, C., Kowall, N.W., and Khrapko, K. (2006). Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet* 38, 518-520.
- Kuznetsov, A.V., Hermann, M., Saks, V., Hengster, P., and Margreiter, R. (2009). The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1928-1939.
- Kwong, J.Q., Beal, M.F., and Manfredi, G. (2006). The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *J Neurochem* 97, 1659-1675.
- Labrousse, A.M., Zappaterra, M.D., Rube, D.A., and van der Bliek, A.M. (1999). *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell* 4, 815-826.

- Lackner, L.L., and Nunnari, J. (2010). Small molecule inhibitors of mitochondrial division: tools that translate basic biological research into medicine. *Chem Biol* 17, 578-583.
- LaMonte, B.H., Wallace, K.E., Holloway, B.A., Shelly, S.S., Ascano, J., Tokito, M., Van Winkle, T., Howland, D.S., and Holzbaur, E.L. (2002). Disruption of dynein/dynactin inhibits axonal transport in motor neurons causing late-onset progressive degeneration. *Neuron* 34, 715-727.
- Landes, T., Emorine, L.J., Courilleau, D., Rojo, M., Belenguer, P., and Arnaune-Pelloquin, L. (2010a). The BH3-only Bnip3 binds to the dynamin Opa1 to promote mitochondrial fragmentation and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO Rep* 11, 459-465.
- Landes, T., Leroy, I., Bertholet, A., Diot, A., Khosrobakhsh, F., Daloyau, M., Davezac, N., Miquel, M.C., Courilleau, D., Guillou, E., et al. (2010b). OPA1 (dys)functions. *Semin Cell Dev Biol* 21, 593-598.
- Langer, T., Kaser, M., Klanner, C., and Leonhard, K. (2001). AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. *Biochem Soc Trans* 29, 431-436.
- Lee, Y.J., Jeong, S.Y., Karbowski, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2004). Roles of the Mammalian mitochondrial fission and fusion mediators fis1, drp1, and opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15, 5001-5011.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P., and Rojo, M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13, 4343-4354.
- Leloup, C., Magnan, C., Benani, A., Bonnet, E., Alquier, T., Offer, G., Carriere, A., Periquet, A., Fernandez, Y., Ktorza, A., et al. (2006). Mitochondrial reactive oxygen species are required for hypothalamic glucose sensing. *Diabetes* 55, 2084-2090.
- Leloup, C., Turrel-Cuzin, C., Magnan, C., Karaca, M., Castel, J., Carneiro, L., Colombani, A.L., Ktorza, A., Casteilla, L., and Penicaud, L. (2009). Mitochondrial reactive oxygen species are obligatory signals for glucose-induced insulin secretion. *Diabetes* 58, 673-681.
- Lenaers, G., Reynier, P., Elachouri, G., Soukkaie, C., Olichon, A., Belenguer, P., Baricault, L., Ducommun, B., Hamel, C., and Delettre, C. (2009). OPA1 functions in mitochondria and dysfunctions in optic nerve. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1866-1874.
- Lenaz, G., and Genova, M.L. (2009). Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 1750-1772.
- Levinson, J.N., and El-Husseini, A. (2005). Building excitatory and inhibitory synapses: balancing neuroligin partnerships. *Neuron* 48, 171-174.
- Lewis, D.V., and Schuette, W.H. (1975). NADH fluorescence and  $[K^+]_o$  changes during hippocampal electrical stimulation. *J Neurophysiol* 38, 405-417.
- Li, H., Chen, Y., Jones, A.F., Sanger, R.H., Collis, L.P., Flannery, R., McNay, E.C., Yu, T., Schwarzenbacher, R., Bossy, B., et al. (2008). Bcl-xL induces Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 2169-2174.
- Li, L.Y., Luo, X., and Wang, X. (2001). Endonuclease G is an apoptotic DNase when released from mitochondria. *Nature* 412, 95-99.

- Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y., and Sheng, M. (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119, 873-887.
- Liguori, M., La Russa, A., Manna, I., Andreoli, V., Caracciolo, M., Spadafora, P., Cittadella, R., and Quattrone, A. (2008). A phenotypic variation of dominant optic atrophy and deafness (ADOAD) due to a novel OPA1 mutation. *J Neurol* 255, 127-129.
- Lin, M.T., and Beal, M.F. (2006). Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787-795.
- Liu, G., Choi, S., and Tsien, R.W. (1999). Variability of neurotransmitter concentration and nonsaturation of postsynaptic AMPA receptors at synapses in hippocampal cultures and slices. *Neuron* 22, 395-409.
- Liu, W., Acin-Perez, R., Geghman, K.D., Manfredi, G., Lu, B., and Li, C. (2011). Pink1 regulates the oxidative phosphorylation machinery via mitochondrial fission. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 12920-12924.
- Liu, W., Vives-Bauza, C., Acin-Perez, R., Yamamoto, A., Tan, Y., Li, Y., Magrane, J., Stavarache, M.A., Shaffer, S., Chang, S., et al. (2009a). PINK1 defect causes mitochondrial dysfunction, proteasomal deficit and alpha-synuclein aggregation in cell culture models of Parkinson's disease. *PLoS One* 4, e4597.
- Liu, X., Weaver, D., Shirihai, O., and Hajnoczky, G. (2009b). Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *Embo J* 28, 3074-3089.
- Liu, Y., Fiskum, G., and Schubert, D. (2002). Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *J Neurochem* 80, 780-787.
- Lodi, R., Tonon, C., Valentino, M.L., Iotti, S., Clementi, V., Malucelli, E., Barboni, P., Longanesi, L., Schimpf, S., Wissinger, B., et al. (2004). Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in OPA1-related dominant optic atrophy. *Ann Neurol* 56, 719-723.
- Lodi, R., Tonon, C., Valentino, M.L., Manners, D., Testa, C., Malucelli, E., La Morgia, C., Barboni, P., Carbonelli, M., Schimpf, S., et al. (2011). Defective mitochondrial adenosine triphosphate production in skeletal muscle from patients with dominant optic atrophy due to OPA1 mutations. *Arch Neurol* 68, 67-73.
- Luscher, B., Fuchs, T., and Kilpatrick, C.L. (2011). GABAA receptor trafficking-mediated plasticity of inhibitory synapses. *Neuron* 70, 385-409.
- Lustbader, J.W., Cirilli, M., Lin, C., Xu, H.W., Takuma, K., Wang, N., Caspersen, C., Chen, X., Pollak, S., Chaney, M., et al. (2004). ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304, 448-452.
- Lynch, M.A. (2004). Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84, 87-136.
- MacAskill, A.F., and Kittler, J.T. (2009). Control of mitochondrial transport and localization in neurons. *Trends Cell Biol* 20, 102-112.
- Mackey, D.A., and Troncone, I. (2010). Genetics: Optic nerve genetics--more than meets the eye. *Nat Rev Neurol* 6, 357-358.
- Magleby, K.L. (2004). Modal gating of NMDA receptors. *Trends Neurosci* 27, 231-233.
- Malenka, R.C., and Bear, M.F. (2004). LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron* 44, 5-21.

- Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1999). Long-term potentiation--a decade of progress? *Science* 285, 1870-1874.
- Malinow, R., and Malenka, R.C. (2002). AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 25, 103-126.
- Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombes, A., and Rojo, M. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep* 6, 853-859.
- Malli, R., Frieden, M., Osibow, K., and Graier, W.F. (2003). Mitochondria efficiently buffer subplasmalemmal Ca<sup>2+</sup> elevation during agonist stimulation. *J Biol Chem* 278, 10807-10815.
- Manczak, M., Anekonda, T.S., Henson, E., Park, B.S., Quinn, J., and Reddy, P.H. (2006). Mitochondria are a direct site of A beta accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Hum Mol Genet* 15, 1437-1449.
- Manczak, M., Calkins, M.J., and Reddy, P.H. (2011). Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet* 20, 2495-2509.
- Mandal, S., Lindgren, A.G., Srivastava, A.S., Clark, A.T., and Banerjee, U. (2010). Mitochondrial Function Controls Proliferation and Early Differentiation Potential of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*.
- Manna, S.K., Zhang, H.J., Yan, T., Oberley, L.W., and Aggarwal, B.B. (1998). Overexpression of manganese superoxide dismutase suppresses tumor necrosis factor-induced apoptosis and activation of nuclear transcription factor-kappaB and activated protein-1. *J Biol Chem* 273, 13245-13254.
- Mannella, C.A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* 1763, 542-548.
- Margineantu, D.H., Gregory Cox, W., Sundell, L., Sherwood, S.W., Beechem, J.M., and Capaldi, R.A. (2002). Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* 1, 425-435.
- Margulis, L. (1981). *Symbiosis in cell evolution* (San Francisco, CA, W.H. Freeman).
- Martin, M., Iyadurai, S.J., Gassman, A., Gindhart, J.G., Jr., Hays, T.S., and Saxton, W.M. (1999). Cytoplasmic dynein, the dynactin complex, and kinesin are interdependent and essential for fast axonal transport. *Mol Biol Cell* 10, 3717-3728.
- Mates, J.M., and Sanchez-Jimenez, F. (1999). Antioxidant enzymes and their implications in pathophysiological processes. *Front Biosci* 4, D339-345.
- Matsuzaki, M., Honkura, N., Ellis-Davies, G.C., and Kasai, H. (2004). Structural basis of long-term potentiation in single dendritic spines. *Nature* 429, 761-766.
- Mattson, M.P., Gleichmann, M., and Cheng, A. (2008). Mitochondria in neuroplasticity and neurological disorders. *Neuron* 60, 748-766.
- Mattson, M.P., and Magnus, T. (2006). Ageing and neuronal vulnerability. *Nat Rev Neurosci* 7, 278-294.

- Mayevsky, A., and Chance, B. (1975). Metabolic responses of the awake cerebral cortex to anoxia hypoxia spreading depression and epileptiform activity. *Brain Res* 98, 149-165.
- Mayorov, V.I., Lowrey, A.J., Biousse, V., Newman, N.J., Cline, S.D., and Brown, M.D. (2008). Mitochondrial oxidative phosphorylation in autosomal dominant optic atrophy. *BMC Biochem* 9, 22.
- McAllister, A.K. (2007). Dynamic aspects of CNS synapse formation. *Annu Rev Neurosci* 30, 425-450.
- McCormack, J.G., Halestrap, A.P., and Denton, R.M. (1990). Role of calcium ions in regulation of mammalian intramitochondrial metabolism. *Physiol Rev* 70, 391-425.
- McCormick, D.A. (1989). GABA as an inhibitory neurotransmitter in human cerebral cortex. *J Neurophysiol* 62, 1018-1027.
- McIntire, S.L., Reimer, R.J., Schuske, K., Edwards, R.H., and Jorgensen, E.M. (1997). Identification and characterization of the vesicular GABA transporter. *Nature* 389, 870-876.
- Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127, 383-395.
- Meeusen, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305, 1747-1752.
- Meier, P., Finch, A., and Evan, G. (2000). Apoptosis in development. *Nature* 407, 796-801.
- Meissner, C., Lorenz, H., Weihofen, A., Selkoe, D.J., and Lemberg, M.K. (2011). The mitochondrial intramembrane protease PARL cleaves human Pink1 to regulate Pink1 trafficking. *J Neurochem* 117, 856-867.
- Merkwirth, C., and Langer, T. (2009). Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1793, 27-32.
- Messerschmitt, M., Jakobs, S., Vogel, F., Fritz, S., Dimmer, K.S., Neupert, W., and Westermann, B. (2003). The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* 160, 553-564.
- Michels, G., and Moss, S.J. (2007). GABAA receptors: properties and trafficking. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42, 3-14.
- Milakovic, T., and Johnson, G.V. (2005). Mitochondrial respiration and ATP production are significantly impaired in striatal cells expressing mutant huntingtin. *J Biol Chem* 280, 30773-30782.
- Miller, K.E., and Sheetz, M.P. (2004). Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J Cell Sci* 117, 2791-2804.
- Min, K.J., Lee, J.T., Joe, E.H., and Kwon, T.K. (2011). An IkappaBalpha phosphorylation inhibitor induces heme oxygenase-1(HO-1) expression through the activation of reactive oxygen species (ROS)-Nrf2-ARE signaling and ROS-PI3K/Akt signaling in an NF-kappaB-independent mechanism. *Cell Signal* 23, 1505-1513.
- Mironov, S.L. (2007). ADP regulates movements of mitochondria in neurons. *Biophys J* 92, 2944-2952.

- Mironov, S.L., and Richter, D.W. (2001). Oscillations and hypoxic changes of mitochondrial variables in neurons of the brainstem respiratory centre of mice. *J Physiol* 533, 227-236.
- Misaka, T., Miyashita, T., and Kubo, Y. (2002). Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in brain, subcellular localization, and effect on mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 277, 15834-15842.
- Misgeld, T., Kerschensteiner, M., Bareyre, F.M., Burgess, R.W., and Lichtman, J.W. (2007). Imaging axonal transport of mitochondria in vivo. *Nat Methods* 4, 559-561.
- Misko, A., Jiang, S., Wegorzewska, I., Milbrandt, J., and Baloh, R.H. (2010). Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci* 30, 4232-4240.
- Mizushima, N. (2007). Collaboration of proteolytic systems. *Autophagy* 3, 179-180.
- Mohrmann, R., Lessmann, V., and Gottmann, K. (2003). Developmental maturation of synaptic vesicle cycling as a distinctive feature of central glutamatergic synapses. *Neuroscience* 117, 7-18.
- Montgomery, J.M., and Madison, D.V. (2004). Discrete synaptic states define a major mechanism of synapse plasticity. *Trends Neurosci* 27, 744-750.
- Morel, Y., and Barouki, R. (1999). Repression of gene expression by oxidative stress. *Biochem J* 342 Pt 3, 481-496.
- Morishita, W., Marie, H., and Malenka, R.C. (2005). Distinct triggering and expression mechanisms underlie LTD of AMPA and NMDA synaptic responses. *Nat Neurosci* 8, 1043-1050.
- Morris, R.L., and Hollenbeck, P.J. (1995). Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol* 131, 1315-1326.
- Mozdy, A.D., McCaffery, J.M., and Shaw, J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 151, 367-380.
- Mulle, C., Sailer, A., Swanson, G.T., Brana, C., O'Gorman, S., Bettler, B., and Heinemann, S.F. (2000). Subunit composition of kainate receptors in hippocampal interneurons. *Neuron* 28, 475-484.
- Myers, R.H. (2004). Huntington's disease genetics. *NeuroRx* 1, 255-262.
- Nakahara, H., Kanno, T., Inai, Y., Utsumi, K., Hiramatsu, M., Mori, A., and Packer, L. (1998). Mitochondrial dysfunction in the senescence accelerated mouse (SAM). *Free Radic Biol Med* 24, 85-92.
- Nakamura, K., Nemani, V.M., Azarbal, F., Skibinski, G., Levy, J.M., Egami, K., Munishkina, L., Zhang, J., Gardner, B., Wakabayashi, J., et al. (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *J Biol Chem* 286, 20710-20726.
- Nangaku, M., Sato-Yoshitake, R., Okada, Y., Noda, Y., Takemura, R., Yamazaki, H., and Hirokawa, N. (1994). KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* 79, 1209-1220.

- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., and Youle, R.J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 8, e1000298.
- Naylor, K., Ingerman, E., Okreglak, V., Marino, M., Hinshaw, J.E., and Nunnari, J. (2006). Mdv1 interacts with assembled dnm1 to promote mitochondrial division. *J Biol Chem* 281, 2177-2183.
- Nguyen, T., Sherratt, P.J., Huang, H.C., Yang, C.S., and Pickett, C.B. (2003). Increased protein stability as a mechanism that enhances Nrf2-mediated transcriptional activation of the antioxidant response element. Degradation of Nrf2 by the 26 S proteasome. *J Biol Chem* 278, 4536-4541.
- Nicholls, D.G., and Budd, S.L. (2000). Mitochondria and neuronal survival. *Physiol Rev* 80, 315-360.
- Nicoll, R.A., and Schmitz, D. (2005). Synaptic plasticity at hippocampal mossy fibre synapses. *Nat Rev Neurosci* 6, 863-876.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A., and Suter, U. (2005). Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 170, 1067-1078.
- Nishioka, K., Vilarino-Guell, C., Cobb, S.A., Kachergus, J.M., Ross, O.A., Hentati, E., Hentati, F., and Farrer, M.J. (2010). Genetic variation of the mitochondrial complex I subunit NDUFB2 and Parkinson's disease. *Parkinsonism Relat Disord* 16, 686-687.
- Nochez, Y., Arsene, S., Gueguen, N., Chevrollier, A., Ferre, M., Guillet, V., Desquirit, V., Toutain, A., Bonneau, D., Procaccio, V., et al. (2009). Acute and late-onset optic atrophy due to a novel OPA1 mutation leading to a mitochondrial coupling defect. *Mol Vis* 15, 598-608.
- Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* 307, 462-465.
- Nunnari, J., Marshall, W.F., Straight, A., Murray, A., Sedat, J.W., and Walter, P. (1997). Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell* 8, 1233-1242.
- Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M., and Van Broeckhoven, C. (2010). Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Hum Mutat* 31, 763-780.
- Okabe, S., Miwa, A., and Okado, H. (2001). Spine formation and correlated assembly of presynaptic and postsynaptic molecules. *J Neurosci* 21, 6105-6114.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 278, 7743-7746.
- Olichon, A., Elachouri, G., Baricault, L., Delettre, C., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2007). OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ* 14, 682-692.
- Olichon, A., Emorine, L.J., Descoins, E., Pelloquin, L., Bricchese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C.P., et al. (2002). The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* 523, 171-176.

- Oliveira, J.M. (2010). Nature and cause of mitochondrial dysfunction in Huntington's disease: focusing on huntingtin and the striatum. *J Neurochem* 114, 1-12.
- Otera, H., and Mihara, K. (2010). Molecular Mechanisms and Physiologic Functions of Mitochondrial Dynamics. *J Biochem*.
- Otera, H., and Mihara, K. (2011). Discovery of the membrane receptor for mitochondrial fission GTPase Drp1. *Small Gtpases* 2, 167-172.
- Owusu-Ansah, E., and Banerjee, U. (2009). Reactive oxygen species prime *Drosophila* haematopoietic progenitors for differentiation. *Nature* 461, 537-541.
- Pacher, P., Thomas, A.P., and Hajnoczky, G. (2002). Ca<sup>2+</sup> marks: miniature calcium signals in single mitochondria driven by ryanodine receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2380-2385.
- Palmer, C.S., Osellame, L.D., Laine, D., Koutsopoulos, O.S., Frazier, A.E., and Ryan, M.T. (2011). MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* 12, 565-573.
- Palty, R., Silverman, W.F., Hershfinkel, M., Caporale, T., Sensi, S.L., Parnis, J., Nolte, C., Fishman, D., Shoshan-Barmatz, V., Herrmann, S., et al. (2010). NCLX is an essential component of mitochondrial Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchange. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 436-441.
- Panov, A.V., Gutekunst, C.A., Leavitt, B.R., Hayden, M.R., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., and Greenamyre, J.T. (2002). Early mitochondrial calcium defects in Huntington's disease are a direct effect of polyglutamines. *Nat Neurosci* 5, 731-736.
- Paoletti, P. (2011). Molecular basis of NMDA receptor functional diversity. *Eur J Neurosci* 33, 1351-1365.
- Parekh, A.B. (2003). Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: dynamic interplay between endoplasmic reticulum, mitochondria and plasma membrane. *J Physiol* 547, 333-348.
- Parekh, A.B. (2008). Mitochondrial regulation of store-operated CRAC channels. *Cell Calcium* 44, 6-13.
- Parihar, M.S., and Brewer, G.J. (2007). Simultaneous age-related depolarization of mitochondrial membrane potential and increased mitochondrial reactive oxygen species production correlate with age-related glutamate excitotoxicity in rat hippocampal neurons. *J Neurosci Res* 85, 1018-1032.
- Park, M.K., Ashby, M.C., Erdemli, G., Petersen, O.H., and Tepikin, A.V. (2001). Perinuclear, perigranular and sub-plasmalemmal mitochondria have distinct functions in the regulation of cellular calcium transport. *EMBO J* 20, 1863-1874.
- Parker, W.D., Jr., Boyson, S.J., and Parks, J.K. (1989). Abnormalities of the electron transport chain in idiopathic Parkinson's disease. *Ann Neurol* 26, 719-723.
- Parone, P.A., Da Cruz, S., Tondera, D., Mattenberger, Y., James, D.I., Maechler, P., Barja, F., and Martinou, J.C. (2008). Preventing mitochondrial fission impairs mitochondrial function and leads to loss of mitochondrial DNA. *PLoS One* 3, e3257.
- Pasdois, P., Deveaud, C., Voisin, P., Bouchaud, V., Rigoulet, M., and Beauvoit, B. (2003). Contribution of the phosphorylable complex I in the growth phase-dependent respiration of C6 glioma cells in vitro. *J Bioenerg Biomembr* 35, 439-450.

- Payne, M., Yang, Z., Katz, B.J., Warner, J.E., Weight, C.J., Zhao, Y., Pearson, E.D., Treft, R.L., Hillman, T., Kennedy, R.J., et al. (2004). Dominant optic atrophy, sensorineural hearing loss, ptosis, and ophthalmoplegia: a syndrome caused by a missense mutation in OPA1. *Am J Ophthalmol* 138, 749-755.
- Pedrola, L., Espert, A., Wu, X., Claramunt, R., Shy, M.E., and Palau, F. (2005). GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet* 14, 1087-1094.
- Pelloquin, L., Belenguer, P., Menon, Y., and Ducommun, B. (1998). Identification of a fission yeast dynamin-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance. *Biochem Biophys Res Commun* 251, 720-726.
- Pelloquin, L., Belenguer, P., Menon, Y., Gas, N., and Ducommun, B. (1999). Fission yeast Msp1 is a mitochondrial dynamin related protein. *J Cell Science* 112, 4151-4161.
- Peng, T.I., and Greenamyre, J.T. (1998). Privileged access to mitochondria of calcium influx through N-methyl-D-aspartate receptors. *Mol Pharmacol* 53, 974-980.
- Perkins, G., Bossy-Wetzell, E., and Ellisman, M.H. (2009). New insights into mitochondrial structure during cell death. *Exp Neurol* 218, 183-192.
- Pesch, U.E., Leo-Kottler, B., Mayer, S., Jurklies, B., Kellner, U., Apfelstedt-Sylla, E., Zrenner, E., Alexander, C., and Wissinger, B. (2001). OPA1 mutations in patients with autosomal dominant optic atrophy and evidence for semi-dominant inheritance. *Hum Mol Genet* 10, 1359-1368.
- Petralia, R.S., Wang, Y.X., Hua, F., Yi, Z., Zhou, A., Ge, L., Stephenson, F.A., and Wenthold, R.J. (2010). Organization of NMDA receptors at extrasynaptic locations. *Neuroscience* 167, 68-87.
- Phung, C.D., Ezieme, J.A., and Turrens, J.F. (1994). Hydrogen peroxide metabolism in skeletal muscle mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 315, 479-482.
- Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacin, M., and Zorzano, A. (2005). The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* 14, 1405-1415.
- Pilling, A.D., Horiuchi, D., Lively, C.M., and Saxton, W.M. (2006). Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. *Mol Biol Cell* 17, 2057-2068.
- Pitter, J.G., Maechler, P., Wollheim, C.B., and Spat, A. (2002). Mitochondria respond to Ca<sup>2+</sup> already in the submicromolar range: correlation with redox state. *Cell Calcium* 31, 97-104.
- Pitts, K.R., Yoon, Y., Krueger, E.W., and McNiven, M.A. (1999). The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 10, 4403-4417.
- Popov, V., Medvedev, N.I., Davies, H.A., and Stewart, M.G. (2005). Mitochondria form a filamentous reticular network in hippocampal dendrites but are present as discrete bodies in axons: a three-dimensional ultrastructural study. *J Comp Neurol* 492, 50-65.
- Praefcke, G.J., and McMahon, H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 133-147.

- Prakriya, M., Feske, S., Gwack, Y., Srikanth, S., Rao, A., and Hogan, P.G. (2006). Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature* 443, 230-233.
- Prange, O., Wong, T.P., Gerrow, K., Wang, Y.T., and El-Husseini, A. (2004). A balance between excitatory and inhibitory synapses is controlled by PSD-95 and neuroligin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 13915-13920.
- Pratico, D., Uryu, K., Leight, S., Trojanoswki, J.Q., and Lee, V.M. (2001). Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci* 21, 4183-4187.
- Prester, T., Talalay, P., Alam, J., Ahn, Y.I., Lee, P.J., and Choi, A.M. (1995). Parallel induction of heme oxygenase-1 and chemoprotective phase 2 enzymes by electrophiles and antioxidants: regulation by upstream antioxidant-responsive elements (ARE). *Mol Med* 1, 827-837.
- Prozorovski, T., Schulze-Topphoff, U., Glumm, R., Baumgart, J., Schroter, F., Ninnemann, O., Siegert, E., Bendix, I., Brustle, O., Nitsch, R., et al. (2008). Sirt1 contributes critically to the redox-dependent fate of neural progenitors. *Nat Cell Biol* 10, 385-394.
- Putney, J.W., Jr. (1986). A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* 7, 1-12.
- Putney, J.W., Jr. (1990). The integration of receptor-regulated intracellular calcium release and calcium entry across the plasma membrane. *Curr Top Cell Regul* 31, 111-127.
- Quintana, A., Schwarz, E.C., Schwindling, C., Lipp, P., Kaestner, L., and Hoth, M. (2006). Sustained activity of calcium release-activated calcium channels requires translocation of mitochondria to the plasma membrane. *J Biol Chem* 281, 40302-40309.
- Rakovic, A., Grunewald, A., Kottwitz, J., Bruggemann, N., Pramstaller, P.P., Lohmann, K., and Klein, C. (2011). Mutations in PINK1 and Parkin impair ubiquitination of Mitofusins in human fibroblasts. *PLoS One* 6, e16746.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W., and Westermann, B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273, 20150-20155.
- Rasola, A., and Bernardi, P. (2007). The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death and in disease pathogenesis. *Apoptosis* 12, 815-833.
- Reddy, P.H., McWeeney, S., Park, B.S., Manczak, M., Gutala, R.V., Partovi, D., Jung, Y., Yau, V., Searles, R., Mori, M., et al. (2004). Gene expression profiles of transcripts in amyloid precursor protein transgenic mice: up-regulation of mitochondrial metabolism and apoptotic genes is an early cellular change in Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 13, 1225-1240.
- Reynier, P., Amati-Bonneau, P., Verny, C., Olichon, A., Simard, G., Guichet, A., Bonnemains, C., Malecaze, F., Malinge, M.C., Pelletier, J.B., et al. (2004). OPA3 gene mutations responsible for autosomal dominant optic atrophy and cataract. *J Med Genet* 41, E110.
- Riedl, S.J., and Salvesen, G.S. (2007). The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 405-413.
- Rintoul, G.L., Bennett, V.J., Papaconstantinou, N.A., and Reynolds, I.J. (2006). Nitric oxide inhibits mitochondrial movement in forebrain neurons associated with disruption of mitochondrial membrane potential. *J Neurochem* 97, 800-806.

- Rintoul, G.L., Filiano, A.J., Brocard, J.B., Kress, G.J., and Reynolds, I.J. (2003). Glutamate decreases mitochondrial size and movement in primary forebrain neurons. *J Neurosci* 23, 7881-7888.
- Rivera, C., Voipio, J., Payne, J.A., Ruusuvuori, E., Lahtinen, H., Lamsa, K., Pirvola, U., Saarma, M., and Kaila, K. (1999). The K<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> co-transporter KCC2 renders GABA hyperpolarizing during neuronal maturation. *Nature* 397, 251-255.
- Rizzuto, R., and Pozzan, T. (2006). Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* 86, 369-408.
- Roberts, L.J., and Morrow, J.D. (2000). Measurement of F(2)-isoprostanes as an index of oxidative stress in vivo. *Free Radic Biol Med* 28, 505-513.
- Robinson, B.H. (1998). Human complex I deficiency: clinical spectrum and involvement of oxygen free radicals in the pathogenicity of the defect. *Biochim Biophys Acta* 1364, 271-286.
- Rodriguez-Moreno, A., Herreras, O., and Lerma, J. (1997). Kainate receptors presynaptically downregulate GABAergic inhibition in the rat hippocampus. *Neuron* 19, 893-901.
- Rogers, K.L., Picaud, S., Roncali, E., Boisgard, R., Colasante, C., Stinnakre, J., Tavitian, B., and Brulet, P. (2007). Non-invasive in vivo imaging of calcium signaling in mice. *PLoS One* 2, e974.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D., and Lombes, A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 115, 1663-1674.
- Rosas, H.D., Liu, A.K., Hersch, S., Glessner, M., Ferrante, R.J., Salat, D.H., van der Kouwe, A., Jenkins, B.G., Dale, A.M., and Fischl, B. (2002). Regional and progressive thinning of the cortical ribbon in Huntington's disease. *Neurology* 58, 695-701.
- Rosignol, R., Gilkerson, R., Aggeler, R., Yamagata, K., Remington, S.J., and Capaldi, R.A. (2004). Energy substrate modulates mitochondrial structure and oxidative capacity in cancer cells. *Cancer Res* 64, 985-993.
- Rui, Y., Tiwari, P., Xie, Z., and Zheng, J.Q. (2006). Acute impairment of mitochondrial trafficking by beta-amyloid peptides in hippocampal neurons. *J Neurosci* 26, 10480-10487.
- Ruthazer, E.S., Akerman, C.J., and Cline, H.T. (2003). Control of axon branch dynamics by correlated activity in vivo. *Science* 301, 66-70.
- Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R.J., and Fuller, M.T. (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116, 2763-2774.
- Santel, A., and Fuller, M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 114, 867-874.
- Santos, S.D., Carvalho, A.L., Caldeira, M.V., and Duarte, C.B. (2009). Regulation of AMPA receptors and synaptic plasticity. *Neuroscience* 158, 105-125.
- Saotome, M., Safiulina, D., Szabadkai, G., Das, S., Fransson, A., Aspenstrom, P., Rizzuto, R., and Hajnoczky, G. (2008). Bidirectional Ca<sup>2+</sup>-dependent control of mitochondrial dynamics by the Miro GTPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 20728-20733.

- Sapp, E., Penney, J., Young, A., Aronin, N., Vonsattel, J.P., and DiFiglia, M. (1999). Axonal transport of N-terminal huntingtin suggests early pathology of corticostriatal projections in Huntington disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 58, 165-173.
- Satoh, M., Hamamoto, T., Seo, N., Kagawa, Y., and Endo, H. (2003). Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 300, 482-493.
- Schaaf, C.P., Blazo, M., Lewis, R.A., Tonini, R.E., Takei, H., Wang, J., Wong, L.J., and Scaglia, F. (2011). Early-onset severe neuromuscular phenotype associated with compound heterozygosity for OPA1 mutations. *Mol Genet Metab* 103, 383-387.
- Schapira, A.H. (1998). Human complex I defects in neurodegenerative diseases. *Biochim Biophys Acta* 1364, 261-270.
- Schapira, A.H., Mann, V.M., Cooper, J.M., Dexter, D., Daniel, S.E., Jenner, P., Clark, J.B., and Marsden, C.D. (1990). Anatomic and disease specificity of NADH CoQ1 reductase (complex I) deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 55, 2142-2145.
- Schauss, A.C., Huang, H., Choi, S.Y., Xu, L., Soubeyrand, S., Bilodeau, P., Zunino, R., Rippstein, P., Frohman, M.A., and McBride, H.M. (2010). A novel cell-free mitochondrial fusion assay amenable for high-throughput screenings of fusion modulators. *BMC Biol* 8, 100.
- Scheffler, I.E. (1999). *Mitochondria* (Wiley-Liss).
- Scheiffele, P. (2003). Cell-cell signaling during synapse formation in the CNS. *Annu Rev Neurosci* 26, 485-508.
- Schimpf, S., Schaich, S., and Wissinger, B. (2006). Activation of cryptic splice sites is a frequent splicing defect mechanism caused by mutations in exon and intron sequences of the OPA1 gene. *Hum Genet* 118, 767-771.
- Schmitz, D., Frerking, M., and Nicoll, R.A. (2000). Synaptic activation of presynaptic kainate receptors on hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron* 27, 327-338.
- Schon, E.A., and Przedborski, S. (2011). Mitochondria: the next (neurode)generation. *Neuron* 70, 1033-1053.
- Schulze-Osthoff, K., Los, M., and Baeuerle, P.A. (1995). Redox signalling by transcription factors NF-kappa B and AP-1 in lymphocytes. *Biochem Pharmacol* 50, 735-741.
- Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., and Korsmeyer, S.J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2, 55-67.
- Selig, D.K., Hjelmstad, G.O., Herron, C., Nicoll, R.A., and Malenka, R.C. (1995). Independent mechanisms for long-term depression of AMPA and NMDA responses. *Neuron* 15, 417-426.
- Sesaki, H., and Jensen, R.E. (2001). UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 152, 1123-1134.
- Sesaki, H., Southard, S.M., Yaffe, M.P., and Jensen, R.E. (2003). Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell* 14, 2342-2356.

- Shah, Z.H., Hakkaart, G.A., Arku, B., de Jong, L., van der Spek, H., Grivell, L.A., and Jacobs, H.T. (2000). The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metalloprotease Yme1p complements a yeast yme1 disruptant. *FEBS Lett* 478, 267-270.
- Shahrestani, P., Leung, H.T., Le, P.K., Pak, W.L., Tse, S., Ocorr, K., and Huang, T. (2009). Heterozygous mutation of *Drosophila* Opa1 causes the development of multiple organ abnormalities in an age-dependent and organ-specific manner. *PLoS One* 4, e6867.
- Shi, S.H., Hayashi, Y., Petralia, R.S., Zaman, S.H., Wenthold, R.J., Svoboda, K., and Malinow, R. (1999). Rapid spine delivery and redistribution of AMPA receptors after synaptic NMDA receptor activation. *Science* 284, 1811-1816.
- Shimizu, S., Mori, N., Kishi, M., Sugata, H., Tsuda, A., and Kubota, N. (2003). A novel mutation in the OPA1 gene in a Japanese patient with optic atrophy. *Am J Ophthalmol* 135, 256-257.
- Shirendeb, U., Reddy, A.P., Manczak, M., Calkins, M.J., Mao, P., Tagle, D.A., and Reddy, P.H. (2011). Abnormal mitochondrial dynamics, mitochondrial loss and mutant huntingtin oligomers in Huntington's disease: implications for selective neuronal damage. *Hum Mol Genet* 20, 1438-1455.
- Shoffner, J.M., Watts, R.L., Juncos, J.L., Torroni, A., and Wallace, D.C. (1991). Mitochondrial oxidative phosphorylation defects in Parkinson's disease. *Ann Neurol* 30, 332-339.
- Shuttleworth, C.W., Brennan, A.M., and Connor, J.A. (2003). NAD(P)H fluorescence imaging of postsynaptic neuronal activation in murine hippocampal slices. *J Neurosci* 23, 3196-3208.
- Silver, I., and Erecinska, M. (1998). Oxygen and ion concentrations in normoxic and hypoxic brain cells. *Adv Exp Med Biol* 454, 7-16.
- Silvestri, L., Caputo, V., Bellacchio, E., Atorino, L., Dallapiccola, B., Valente, E.M., and Casari, G. (2005). Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Hum Mol Genet* 14, 3477-3492.
- Sinagra, M., Verrier, D., Frankova, D., Korwek, K.M., Blahos, J., Weeber, E.J., Manzoni, O.J., and Chavis, P. (2005). Reelin, very-low-density lipoprotein receptor, and apolipoprotein E receptor 2 control somatic NMDA receptor composition during hippocampal maturation in vitro. *J Neurosci* 25, 6127-6136.
- Singaravelu, K., Nelson, C., Bakowski, D., de Brito, O.M., Ng, S.W., Di Capite, J., Powell, T., Scorrano, L., and Parekh, A.B. (2011). Mitofusin 2 regulates STIM1 migration from the Ca<sup>2+</sup> store to the plasma membrane in cells with depolarized mitochondria. *J Biol Chem* 286, 12189-12201.
- Skulachev, V.P. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci* 26, 23-29.
- Smeitink, J., Sengers, R., Trijbels, F., and van den Heuvel, L. (2001). Human NADH:ubiquinone oxidoreductase. *J Bioenerg Biomembr* 33, 259-266.
- Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., and van Der Bliek, A.M. (2001). Dynamin-related protein drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12, 2245-2256.
- Smirnova, E., Shurland, D.L., Ryazantsev, S.N., and van der Bliek, A.M. (1998). A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* 143, 351-358.

- Smith, J., Ladi, E., Mayer-Proschel, M., and Noble, M. (2000). Redox state is a central modulator of the balance between self-renewal and differentiation in a dividing glial precursor cell. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10032-10037.
- Smith, M.J., Pozo, K., Brickley, K., and Stephenson, F.A. (2006). Mapping the GRIF-1 binding domain of the kinesin, KIF5C, substantiates a role for GRIF-1 as an adaptor protein in the anterograde trafficking of cargoes. *J Biol Chem* 281, 27216-27228.
- Song, W., Chen, J., Petrilli, A., Liot, G., Klingmayr, E., Zhou, Y., Poquiz, P., Tjong, J., Pouladi, M.A., Hayden, M.R., et al. (2011). Mutant huntingtin binds the mitochondrial fission GTPase dynamin-related protein-1 and increases its enzymatic activity. *Nat Med* 17, 377-382.
- Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C., and Chan, D.C. (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* 178, 749-755.
- Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J.M., Frey, T.G., and Chan, D.C. (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell* 20, 3525-3532.
- Spinazzi, M., Cazzola, S., Bortolozzi, M., Baracca, A., Loro, E., Casarin, A., Solaini, G., Sgarbi, G., Casalena, G., Cenacchi, G., et al. (2008). A novel deletion in the GTPase domain of OPA1 causes defects in mitochondrial morphology and distribution, but not in function. *Hum Mol Genet* 17, 3291-3302.
- Squitieri, F., Cannella, M., Sgarbi, G., Maglione, V., Falleni, A., Lenzi, P., Baracca, A., Cislighi, G., Saft, C., Ragona, G., et al. (2006). Severe ultrastructural mitochondrial changes in lymphoblasts homozygous for Huntington disease mutation. *Mech Ageing Dev* 127, 217-220.
- Stojanovski, D., Koutsopoulos, O.S., Okamoto, K., and Ryan, M.T. (2004). Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci* 117, 1201-1210.
- Stowers, R.S., Megeath, L.J., Gorska-Andrzejak, J., Meinertzhagen, I.A., and Schwarz, T.L. (2002). Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel Drosophila protein. *Neuron* 36, 1063-1077.
- Strock, J., and Diverse-Pierluissi, M.A. (2004). Ca<sup>2+</sup> channels as integrators of G protein-mediated signaling in neurons. *Mol Pharmacol* 66, 1071-1076.
- Stuart, J.A., Mayard, S., Hashiguchi, K., Souza-Pinto, N.C., and Bohr, V.A. (2005). Localization of mitochondrial DNA base excision repair to an inner membrane-associated particulate fraction. *Nucleic Acids Res* 33, 3722-3732.
- Sudhof, T.C. (2004). The synaptic vesicle cycle. *Annu Rev Neurosci* 27, 509-547.
- Sugioka, R., Shimizu, S., and Tsujimoto, Y. (2004). Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 279, 52726-52734.
- Sun, B., Halabisky, B., Zhou, Y., Palop, J.J., Yu, G., Mucke, L., and Gan, L. (2009). Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell* 5, 624-633.
- Sun, M.G., Williams, J., Munoz-Pinedo, C., Perkins, G.A., Brown, J.M., Ellisman, M.H., Green, D.R., and Frey, T.G. (2007). Correlated three-dimensional light and electron

microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis. *Nat Cell Biol* 9, 1057-1065.

Sung, J.Y., Engmann, O., Teylan, M.A., Nairn, A.C., Greengard, P., and Kim, Y. (2008). WAVE1 controls neuronal activity-induced mitochondrial distribution in dendritic spines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 3112-3116.

Susin, S.A., Lorenzo, H.K., Zamzami, N., Marzo, I., Snow, B.E., Brothers, G.M., Mangion, J., Jacotot, E., Costantini, P., Loeffler, M., et al. (1999). Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 397, 441-446.

Susin, S.A., Zamzami, N., Castedo, M., Hirsch, T., Marchetti, P., Macho, A., Daugas, E., Geuskens, M., and Kroemer, G. (1996). Bcl-2 inhibits the mitochondrial release of an apoptogenic protease. *J Exp Med* 184, 1331-1341.

Suzukawa, K., Miura, K., Mitsushita, J., Resau, J., Hirose, K., Crystal, R., and Kamata, T. (2000). Nerve growth factor-induced neuronal differentiation requires generation of Rac1-regulated reactive oxygen species. *J Biol Chem* 275, 13175-13178.

Sykiotis, G.P., and Bohmann, D. (2010). Stress-activated cap'n'collar transcription factors in aging and human disease. *Sci Signal* 3, re3.

Szabadkai, G., Simoni, A.M., Bianchi, K., De Stefani, D., Leo, S., Wieckowski, M.R., and Rizzuto, R. (2006). Mitochondrial dynamics and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Biochim Biophys Acta* 1763, 442-449.

Szabadkai, G., Simoni, A.M., Chami, M., Wieckowski, M.R., Youle, R.J., and Rizzuto, R. (2004). Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca<sup>2+</sup> waves and protects against Ca<sup>2+</sup>-mediated apoptosis. *Mol Cell* 16, 59-68.

Szabo, I., Bernardi, P., and Zoratti, M. (1992). Modulation of the mitochondrial megachannel by divalent cations and protons. *J Biol Chem* 267, 2940-2946.

Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T., and Mihara, K. (2007). Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 282, 11521-11529.

Takeda, T., Hosokawa, M., Takeshita, S., Irino, M., Higuchi, K., Matsushita, T., Tomita, Y., Yasuhira, K., Hamamoto, H., Shimizu, K., et al. (1981). A new murine model of accelerated senescence. *Mech Ageing Dev* 17, 183-194.

Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.F., Karbowski, M., and Youle, R.J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol* 191, 1367-1380.

Tang, S., Le, P.K., Tse, S., Wallace, D.C., and Huang, T. (2009). Heterozygous mutation of Opa1 in *Drosophila* shortens lifespan mediated through increased reactive oxygen species production. *PLoS One* 4, e4492.

Tashiro, A., Dunaevsky, A., Blazeski, R., Mason, C.A., and Yuste, R. (2003). Bidirectional regulation of hippocampal mossy fiber filopodial motility by kainate receptors: a two-step model of synaptogenesis. *Neuron* 38, 773-784.

Tejada-Simon, M.V., Serrano, F., Villasana, L.E., Kanterewicz, B.I., Wu, G.Y., Quinn, M.T., and Klann, E. (2005). Synaptic localization of a functional NADPH oxidase in the mouse hippocampus. *Mol Cell Neurosci* 29, 97-106.

- Territo, P.R., Mootha, V.K., French, S.A., and Balaban, R.S. (2000). Ca<sup>2+</sup> activation of heart mitochondrial oxidative phosphorylation: role of the F<sub>0</sub>/F<sub>1</sub>-ATPase. *Am J Physiol Cell Physiol* 278, C423-435.
- Thayer, S.A., and Miller, R.J. (1990). Regulation of the intracellular free calcium concentration in single rat dorsal root ganglion neurones in vitro. *J Physiol* 425, 85-115.
- Thimmulappa, R.K., Mai, K.H., Srisuma, S., Kensler, T.W., Yamamoto, M., and Biswal, S. (2002). Identification of Nrf2-regulated genes induced by the chemopreventive agent sulforaphane by oligonucleotide microarray. *Cancer Res* 62, 5196-5203.
- Thinakaran, G., and Koo, E.H. (2008). Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283, 29615-29619.
- Thomas, C.G., Miller, A.J., and Westbrook, G.L. (2006). Synaptic and extrasynaptic NMDA receptor NR2 subunits in cultured hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 95, 1727-1734.
- Tondera, D., Czauderna, F., Paulick, K., Schwarzer, R., Kaufmann, J., and Santel, A. (2005). The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Sci* 118, 3049-3059.
- Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., et al. (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 28, 1589-1600.
- Tracy, T.E., Yan, J.J., and Chen, L. (2011). Acute knockdown of AMPA receptors reveals a trans-synaptic signal for presynaptic maturation. *EMBO J* 30, 1577-1592.
- Treiman, D.M. (2001). GABAergic mechanisms in epilepsy. *Epilepsia* 42 Suppl 3, 8-12.
- Tretter, V., Jacob, T.C., Mukherjee, J., Fritschy, J.M., Pangalos, M.N., and Moss, S.J. (2008). The clustering of GABA(A) receptor subtypes at inhibitory synapses is facilitated via the direct binding of receptor alpha 2 subunits to gephyrin. *J Neurosci* 28, 1356-1365.
- Triller, A., and Choquet, D. (2008). New concepts in synaptic biology derived from single-molecule imaging. *Neuron* 59, 359-374.
- Tsatmali, M., Walcott, E.C., and Crossin, K.L. (2005). Newborn neurons acquire high levels of reactive oxygen species and increased mitochondrial proteins upon differentiation from progenitors. *Brain Res* 1040, 137-150.
- Turrens, J.F. (1997). Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* 17, 3-8.
- Turrens, J.F. (2003). Mitochondrial formation of reactive oxygen species. *J Physiol* 552, 335-344.
- Turrens, J.F., Alexandre, A., and Lehninger, A.L. (1985). Ubisemiquinone is the electron donor for superoxide formation by complex III of heart mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 237, 408-414.
- Turrens, J.F., Freeman, B.A., Levitt, J.G., and Crapo, J.D. (1982). The effect of hyperoxia on superoxide production by lung submitochondrial particles. *Arch Biochem Biophys* 217, 401-410.
- Turrigiano, G.G., and Nelson, S.B. (2004). Homeostatic plasticity in the developing nervous system. *Nat Rev Neurosci* 5, 97-107.

- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo J* 27, 433-446.
- Tyzio, R., Represa, A., Jorquera, I., Ben-Ari, Y., Gozlan, H., and Aniksztejn, L. (1999). The establishment of GABAergic and glutamatergic synapses on CA1 pyramidal neurons is sequential and correlates with the development of the apical dendrite. *J Neurosci* 19, 10372-10382.
- Uo, T., Dworzak, J., Kinoshita, C., Inman, D.M., Kinoshita, Y., Horner, P.J., and Morrison, R.S. (2009). Drp1 levels constitutively regulate mitochondrial dynamics and cell survival in cortical neurons. *Exp Neurol* 218, 274-285.
- Vallat, J.M., Ouvrier, R.A., Pollard, J.D., Magdelaine, C., Zhu, D., Nicholson, G.A., Grew, S., Ryan, M.M., and Funalot, B. (2008). Histopathological findings in hereditary motor and sensory neuropathy of axonal type with onset in early childhood associated with mitofusin 2 mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 1097-1102.
- van Loo, G., Schotte, P., van Gorp, M., Demol, H., Hoorelbeke, B., Gevaert, K., Rodriguez, I., Ruiz-Carrillo, A., Vandekerckhove, J., Declercq, W., et al. (2001). Endonuclease G: a mitochondrial protein released in apoptosis and involved in caspase-independent DNA degradation. *Cell Death Differ* 8, 1136-1142.
- Varadi, A., Johnson-Cadwell, L.I., Cirulli, V., Yoon, Y., Allan, V.J., and Rutter, G.A. (2004). Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci* 117, 4389-4400.
- Vaux, D.L., and Silke, J. (2003). Mammalian mitochondrial IAP binding proteins. *Biochem Biophys Res Commun* 304, 499-504.
- Verhoeven, K., Claeys, K.G., Zuchner, S., Schroder, J.M., Weis, J., Ceuterick, C., Jordanova, A., Nelis, E., De Vriendt, E., Van Hul, M., et al. (2006). MFN2 mutation distribution and genotype/phenotype correlation in Charcot-Marie-Tooth type 2. *Brain* 129, 2093-2102.
- Verstreken, P., Ly, C.V., Venken, K.J., Koh, T.W., Zhou, Y., and Bellen, H.J. (2005). Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* 47, 365-378.
- Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R.L., Kim, J., May, J., Tocilescu, M.A., Liu, W., Ko, H.S., et al. (2011). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 378-383.
- Voccoli, V., and Colombaioni, L. (2009). Mitochondrial remodeling in differentiating neuroblasts. *Brain Res* 1252, 15-29.
- Votruba, M., Moore, A.T., and Bhattacharya, S.S. (1998). Clinical features, molecular genetics, and pathophysiology of dominant optic atrophy. *J Med Genet* 35, 793-800.
- Wagner, K.M., Ruegg, M., Niemann, A., and Suter, U. (2009). Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PLoS One* 4, e5160.
- Wagner, O.I., Lifshitz, J., Janmey, P.A., Linden, M., McIntosh, T.K., and Letierrier, J.F. (2003). Mechanisms of mitochondria-neurofilament interactions. *J Neurosci* 23, 9046-9058.
- Waites, C.L., Craig, A.M., and Garner, C.C. (2005). Mechanisms of vertebrate synaptogenesis. *Annu Rev Neurosci* 28, 251-274.

- Wakabayashi, J., Zhang, Z., Wakabayashi, N., Tamura, Y., Fukaya, M., Kensler, T.W., Iijima, M., and Sesaki, H. (2009). The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J Cell Biol* 186, 805-816.
- Wallace, D. (1997). ADN mitochondrial, maladies et vieillissement. *Pour la Science* 240, 52-60.
- Wang, C., and Youle, R.J. (2009). The Role of Mitochondria in Apoptosis. *Annu Rev Genet*.
- Wang, H.L., Chou, A.H., Wu, A.S., Chen, S.Y., Weng, Y.H., Kao, Y.C., Yeh, T.H., Chu, P.J., and Lu, C.S. (2011). PARK6 PINK1 mutants are defective in maintaining mitochondrial membrane potential and inhibiting ROS formation of substantia nigra dopaminergic neurons. *Biochim Biophys Acta* 1812, 674-684.
- Wang, X., and Schwarz, T.L. (2009). The mechanism of Ca<sup>2+</sup>-dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell* 136, 163-174.
- Wang, X., Su, B., Lee, H.G., Li, X., Perry, G., Smith, M.A., and Zhu, X. (2009). Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29, 9090-9103.
- Wang, X., Su, B., Siedlak, S.L., Moreira, P.I., Fujioka, H., Wang, Y., Casadesus, G., and Zhu, X. (2008). Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19318-19323.
- Wasiak, S., Zunino, R., and McBride, H.M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* 177, 439-450.
- Waterham, H.R., Koster, J., van Roermund, C.W., Mooyer, P.A., Wanders, R.J., and Leonard, J.V. (2007). A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med* 356, 1736-1741.
- Waterman-Storer, C.M., Karki, S.B., Kuznetsov, S.A., Tabb, J.S., Weiss, D.G., Langford, G.M., and Holzbaur, E.L. (1997). The interaction between cytoplasmic dynein and dynactin is required for fast axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94, 12180-12185.
- Wei, M.C., Lindsten, T., Mootha, V.K., Weiler, S., Gross, A., Ashiya, M., Thompson, C.B., and Korsmeyer, S.J. (2000). tBID, a membrane-targeted death ligand, oligomerizes BAK to release cytochrome c. *Genes Dev* 14, 2060-2071.
- Weihofen, A., Thomas, K.J., Ostaszewski, B.L., Cookson, M.R., and Selkoe, D.J. (2009). Pink1 forms a multiprotein complex with Miro and Milton, linking Pink1 function to mitochondrial trafficking. *Biochemistry* 48, 2045-2052.
- Wenger, R.H. (2002). Cellular adaptation to hypoxia: O<sub>2</sub>-sensing protein hydroxylases, hypoxia-inducible transcription factors, and O<sub>2</sub>-regulated gene expression. *FASEB J* 16, 1151-1162.
- Wilkerson, D.C., and Sankar, U. (2011). Mitochondria: A sulfhydryl oxidase and fission GTPase connect mitochondrial dynamics with pluripotency in embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*.
- Williams, P.A., Morgan, J.E., and Votruba, M. (2010). Opa1 deficiency in a mouse model of dominant optic atrophy leads to retinal ganglion cell dendropathy. *Brain* 133, 2942-2951.

- Wilson, R.I., and Nicoll, R.A. (2002). Endocannabinoid signaling in the brain. *Science* 296, 678-682.
- Winklhofer, K.F., and Haass, C. (2010). Mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Biochim Biophys Acta* 1802, 29-44.
- Wong, E.D., Wagner, J.A., Scott, S.V., Okreglak, V., Holewinske, T.J., Cassidy-Stone, A., and Nunnari, J. (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 160, 303-311.
- Wong, W.T., and Wong, R.O. (2001). Changing specificity of neurotransmitter regulation of rapid dendritic remodeling during synaptogenesis. *Nat Neurosci* 4, 351-352.
- Wood-Kaczmar, A., Gandhi, S., Yao, Z., Abramov, A.Y., Miljan, E.A., Keen, G., Stanyer, L., Hargreaves, I., Klupsch, K., Deas, E., et al. (2008). PINK1 is necessary for long term survival and mitochondrial function in human dopaminergic neurons. *PLoS One* 3, e2455.
- Yamaguchi, R., Lartigue, L., Perkins, G., Scott, R.T., Dixit, A., Kushnareva, Y., Kuwana, T., Ellisman, M.H., and Newmeyer, D.D. (2008). Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Mol Cell* 31, 557-569.
- Yang, Y., Ouyang, Y., Yang, L., Beal, M.F., McQuibban, A., Vogel, H., and Lu, B. (2008). Pink1 regulates mitochondrial dynamics through interaction with the fission/fusion machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 7070-7075.
- Yao, J., Irwin, R.W., Zhao, L., Nilsen, J., Hamilton, R.T., and Brinton, R.D. (2009). Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer's pathology in female mouse model of Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14670-14675.
- Yarosh, W., Monserrate, J., Tong, J.J., Tse, S., Le, P.K., Nguyen, K., Brachmann, C.B., Wallace, D.C., and Huang, T. (2008). The molecular mechanisms of OPA1-mediated optic atrophy in *Drosophila* model and prospects for antioxidant treatment. *PLoS Genet* 4, e6.
- Yeckel, M.F., Kapur, A., and Johnston, D. (1999). Multiple forms of LTP in hippocampal CA3 neurons use a common postsynaptic mechanism. *Nat Neurosci* 2, 625-633.
- Yermolaieva, O., Brot, N., Weissbach, H., Heinemann, S.H., and Hoshi, T. (2000). Reactive oxygen species and nitric oxide mediate plasticity of neuronal calcium signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 448-453.
- Yi, M., Weaver, D., and Hajnocy, G. (2004). Control of mitochondrial motility and distribution by the calcium signal: a homeostatic circuit. *J Cell Biol* 167, 661-672.
- Yoon, Y., Krueger, E.W., Oswald, B.J., and McNiven, M.A. (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 23, 5409-5420.
- Yoon, Y., Pitts, K.R., and McNiven, M.A. (2001). Mammalian dynamin-like protein dlp1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell* 12, 2894-2905.
- Youle, R.J., and Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 9-14.
- Yu, W., Sun, Y., Guo, S., and Lu, B. (2011). The PINK1/Parkin pathway regulates mitochondrial dynamics and function in mammalian hippocampal and dopaminergic neurons. *Hum Mol Genet* 20, 3227-3240.

- Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P.G., Gorman, G.S., Lourenco, C.M., Wright, A.F., Auer-Grumbach, M., Toscano, A., Musumeci, O., Valentino, M.L., Caporali, L., et al. (2010). Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. *Brain* 133, 771-786.
- Yuste, R., and Bonhoeffer, T. (2001). Morphological changes in dendritic spines associated with long-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci* 24, 1071-1089.
- Zalutsky, R.A., and Nicoll, R.A. (1990). Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* 248, 1619-1624.
- Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A.M., Karbowski, M., Youle, R.J., Schimpf, S., Wissinger, B., Pinti, M., Cossarizza, A., Vidoni, S., et al. (2008). OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 131, 352-367.
- Zeviani, M. (2008). Train, train, train! No pain, just gain. *Brain* 131, 2809-2811.
- Zhang, Z., Wakabayashi, N., Wakabayashi, J., Tamura, Y., Song, W.J., Sereda, S., Clerc, P., Polster, B.M., Aja, S.M., Pletnikov, M.V., et al. (2011). The dynamin-related GTPase Opa1 is required for glucose-stimulated ATP production in pancreatic beta cells. *Mol Biol Cell* 22, 2235-2245.
- Zhao, C., Takita, J., Tanaka, Y., Setou, M., Nakagawa, T., Takeda, S., Yang, H.W., Terada, S., Nakata, T., Takei, Y., et al. (2001). Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 105, 587-597.
- Zhao, F., Wu, T., Lau, A., Jiang, T., Huang, Z., Wang, X.J., Chen, W., Wong, P.K., and Zhang, D.D. (2009a). Nrf2 promotes neuronal cell differentiation. *Free Radic Biol Med* 47, 867-879.
- Zhao, J., Liu, T., Jin, S.B., Tomilin, N., Castro, J., Shupliakov, O., Lendahl, U., and Nister, M. (2009b). The novel conserved mitochondrial inner-membrane protein MTGM regulates mitochondrial morphology and cell proliferation. *J Cell Sci* 122, 2252-2262.
- Zheng, J.Q., Felder, M., Connor, J.A., and Poo, M.M. (1994). Turning of nerve growth cones induced by neurotransmitters. *Nature* 368, 140-144.
- Zhou, C., Huang, Y., Shao, Y., May, J., Prou, D., Perier, C., Dauer, W., Schon, E.A., and Przedborski, S. (2008). The kinase domain of mitochondrial PINK1 faces the cytoplasm. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 12022-12027.
- Zhu, X., Smith, M.A., Perry, G., and Aliev, G. (2004). Mitochondrial failures in Alzheimer's disease. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* 19, 345-352.
- Zick, M., Duvezin-Caubet, S., Schafer, A., Vogel, F., Neupert, W., and Reichert, A.S. (2009). Distinct roles of the two isoforms of the dynamin-like GTPase Mgm1 in mitochondrial fusion. *FEBS Lett* 583, 2237-2243.
- Ziv, N.E., and Smith, S.J. (1996). Evidence for a role of dendritic filopodia in synaptogenesis and spine formation. *Neuron* 17, 91-102.
- Zoratti, M., and Szabo, I. (1995). The mitochondrial permeability transition. *Biochim Biophys Acta* 1241, 139-176.
- Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., et al. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36, 449-451.

Zunino, R., Schauss, A., Rippstein, P., Andrade-Navarro, M., and McBride, H.M. (2007). The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci* 120, 1178-1188.





**The mitochondrial fusogenic GTP-ase OPA1 is required for neuronal maturation  
*ex vivo***

Running title: *OPA1 is required for neuronal maturation*

Bertholet A.M.<sup>1</sup>, Guillermin O.<sup>1</sup>, Millet A.<sup>1</sup>, Davezac N.<sup>1</sup>, Miquel\* M.-C.<sup>1,2</sup> and  
Belenguer\* P.<sup>1</sup>

1, Université de Toulouse, Centre de Biologie du Développement, CNRS  
UMR5547/Université Paul Sabatier, Toulouse, France;

2, UPMC Sorbonne Universités, France.

\*share senior authorship

Corresponding Author (full address, tel, mail)

Belenguer\* P., CNRS UMR 5547/Université Paul Sabatier, Bât 4R3B2, 118 route de  
Narbonne, 31400 Toulouse, France; 33-561556238; pascale.belenguer@cict.fr.

**Number of words**

16 pages, 3 figures, 1 table

Abstract: 192 words

Introduction: 494 words

Discussion: 1310 words

Total number of words (Abstract, Introduction, Materials & Methods, Results, Discussion,  
References and Figure Legends): 4500

**Conflict of Interest:** The Authors declare no conflict of interest.

**Acknowledgments**

We thank Vincent Setola, Jean-Michel Peyrin and Didier Miquel-Vilette for critical reading of  
the manuscript and fruitful discussions. This project was supported by grants from CNRS,

Université Paul Sabatier, Rétina-France, AFM, AMMI. A.B. was funded by the French Ministry for Research and Education for PhD studies and Rétina-France.

### **Abstract:**

Mitochondrial dynamics control the organelle's morphology, with fusion leading to the formation of elongated tubules and fission leading to isolated puncta. Recent reports have suggested that disruptions of mitochondrial dynamics contribute to neurodegenerative diseases. Studies have mainly focused on fission, primarily related to apoptosis; thus, little is known about the role of mitochondrial fusion in neuronal physiology. Here, we report a striking transitory mitochondrial hyperfilamentation during *ex vivo* neuronal maturation at the onset of synaptic protein expression. This occurs simultaneously with transient increases in ROS levels and NRF2 nuclear translocation, suggesting a link between mitochondrial hyperfilamentation and ROS- and NRF2-dependent modulation of neuronal maturation. Furthermore, disruption of mitochondrial filamentation by knockdown of the fusogenic protein OPA1, previously linked to type 1 autosomal dominant optic atrophy (ADOA-1), markedly impaired synaptogenesis *via* reductions in pre- and post- synaptic structural protein expression. This impaired maturation was accompanied by decreases in mitochondrial membrane potential, respiratory chain complex protein expression, and ROS levels. Altogether, these findings suggest a new role for OPA1 in synaptic maturation through maintenance of proper mitochondrial oxidative metabolism, highlighting the role of mitochondrial dynamics in neuronal functioning and providing insights into ADOA-1 pathogenesis.

### **Introduction**

Mitochondrial morphology varies according to cell type and cellular context, ranging from an interconnected filamentous network to isolated spherical vesicles, depending

both on the cytoskeleton, which controls mitochondrial distribution and motility (Boldogh and Pon, 2007), and on recently discovered mitochondrial dynamics (Westermann, 2010). This dynamic balance between fission and fusion of mitochondrial membranes depends on protein complexes conserved throughout evolution. Increasing fusion leads to interconnected mitochondrial filaments; increasing fission leads to isolated dot-like structures. Key fission actors are DRP1 and FIS1, while the mitofusins (MFN1 and MFN2) and OPA1 control fusion. The functional relevance of mitochondrial dynamics is emphasized both by its repercussions on such key processes as respiration, calcium homeostasis, ROS production, apoptosis, and by its requirement during embryonic development (Detmer and Chan, 2007). Homozygous mutation of OPA1, or knockout of MFN1, MFN2, or DRP1 all lead to embryonic lethality in mice, and conditional MFN2 and DRP1 knockouts are associated with defects in CNS neuronal development (Chen et al., 2007; Ishihara et al., 2009). Furthermore, mutations of MFN2 and OPA1 are responsible for type 2 Charcot-Marie-Tooth periphery neuropathy (Zuchner et al., 2004) and type 1 autosomal dominant optic atrophy (ADOA-1) (Delettre et al., 2000), respectively. Altogether, these data highlight the importance of mitochondrial dynamics in neurons.

The highly specialized nature and architecture of neurons presents a challenge for mitochondria, which must furnish energy and buffer calcium in remote parts of the cell and in specialized domains. To meet these needs, mitochondria require adaptive dynamics involving cytoskeleton-dependent distribution and motility and fine tuning of fusion and fission process (Cheng et al., 2010). As yet, the exact influence of mitochondrial dynamics on neuronal plasticity and function is poorly understood, but recent work has revealed clues. Inactivation of mitochondrial fission was shown by one group to lead to a decrease in the number of dendritic mitochondria, dendritic spines, and synapses in cultured neurons (Li et al., 2004), and by another group to alter synaptic mitochondrial localization and neurotransmission at the neuromuscular

junction *in vivo* (Verstreken et al., 2005). Similarly, in developing neurons, mitochondrial dynamics must adapt to the numerous morphological changes that occur during differentiation, from neuritogenesis to synaptogenesis, requiring increases in energy and tight control of cytoplasmic calcium concentrations.

In order to understand the role of mitochondrial dynamics during neuronal maturation, we studied rat primary cortical neurons and observed a transitory increase in mitochondrial filament length associated with marked changes in the expression levels of proteins involved in mitochondrial dynamics. This morphological change occurs at the onset of synaptogenesis simultaneously to transitory increases in ROS levels and NRF2 nuclear translocation. This observation suggests that mitochondrial hyperfilamentation acts upstream of a ROS-dependent NRF2 transcriptional activity, possibly impacting neuronal maturation. Down-regulation of the fusogenic OPA1 protein leads to mitochondrial fragmentation associated to mitochondrial membrane potential drop, reduction in ROS levels, and decreases in synaptic protein expression. Altogether, our results argue for a new role for OPA1 in synaptogenesis during neuronal maturation through regulation of mitochondrial oxidative metabolism.

## **Materials and Methods**

### **Primary culture and transfection**

All animals in this study were ethically maintained and used in compliance with the Policy on Ethics approved by the Society for Neuroscience. Embryos were removed at E17 from pregnant Wistar rats (Janvier) under intraperitoneal pentobarbitol (Sigma) anesthesia. Cortices were dissected, enzymatically dissociated with papain (10 U/mL, Sigma), and plated on poly-D-lysine (0.1 mg/mL, Sigma)-coated glass coverslips. Cultures were grown in Neurobasal (Eurobio) supplemented with B27

(Invitrogen), 2 mM glutamine, and 0.1% penicillin and streptomycin (Gibco) at a density of  $7.10^5$  cells per  $\text{cm}^2$ .

Cells were electroporated after dissociation using the Rat Neuron Nucleofector® Kit, (AMAXA®, Lonza) with, for  $5.10^6$  cells, 3  $\mu\text{g}$  of control luciferase or OPA1 siRNA (Dharmacon), with or without MitoDSRed2 plasmid (Clontech).

### **Measurement of ROS and mitochondrial membrane potential**

ROS levels were measured ( $\lambda\text{Ex}490/\lambda\text{Em}520$  nm) after loading the cells with the fluorescent dye 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (CM-H<sub>2</sub>DCFDA, Molecular Probes) at 4  $\mu\text{M}$  for 30 min at 37°C. Mitochondrial membrane potential was measured ( $\lambda\text{Ex}488/\lambda\text{Em}525-590$  nm) after loading the cells with the cationic dye 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3' tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1, Invitrogen) at 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  for 20 min at 37°C. In both cases, fluorescence was quantified using a Wallac spectrofluorimeter (Perkin Elmer).

### **Immunocytochemistry**

Cells were fixed with PBS containing 3.7% Formaldehyde for 20 min, permeabilized for 15 min in PBS-1% BSA-0.3% Triton X-100 and blocked for 1 hour in PBS containing 5% NGS, 3% BSA, 0.5% Tween20. Methanol fixation (10min, -20°C) was done prior to nuclear NRF2 detection. Polyclonal antibodies against Map2, Beta3-tubulin (both 1/1000, Sigma), NRF2 (Santa Cruz, 1/50) and/or monoclonal antibodies against all five mitochondrial respiratory complexes (OxPho 1/50, MitoSciences) were incubated overnight at 4°C in blocking solution. Cells were then incubated with appropriate Alexa-conjugated secondary antibodies (1/1000, Molecular Probe), and then labeled using DAPI (Sigma) and mounted in Mowiol. Immunolabeling was visualized under a fluorescence microscope (Nikon Eclipse 80i), and images were acquired using NIS-

Element (Nikon Digital Sight DSU2 camera). Dendrites length and branching were measured using NeuronJ complement to ImageJ software (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) from ten neurons per well from digitized images (x100) (3 wells per treatment per experiment, n=3 independent experiments). Mitochondria size was measured in the somatic/proximal part of neurites using ImageJ software from confocal images (63X, SP2-Leica) of ten independent fields per well (3 wells per treatment per experiment, n=3 independent experiments, n = 3, 5000 mitochondria per 100 neurons per time point on average).

### **Immunoblot**

Cells were scraped and resuspended in Laemmli sample buffer. Proteins were subjected to SDS-PAGE and electroblotted onto nitrocellulose membranes. After blocking in TBST-5% dry low fat milk, membranes were treated with various primary antibodies [anti-actin (1/10000, Chemicon), anti-DRP1 (1/200, BD Biosciences), anti-HSP60 (LK2, 1/200, Sigma), anti-MFN1 (1/50, gift from M. Rojo, Bordeaux), anti-MFN2 (1/200, Abnova), anti-OPA1 (1/300, BD Biosciences), anti-PSD95 (1/800, Millipore), anti-synapsin (1/800, Synaptic Systems), anti-synaptophysin (1/500, Abcam)] overnight at 4°C in blocking buffer. After enhanced chemiluminescent detection of HRP-labeled secondary antibodies (1/10000, Abcam), scanned photographic films were analyzed using Image J software.

### **Statistical analysis**

Unless otherwise stated, statistical significance was determined by Student's T-test, \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001).

## **Results**

### **1. Mitochondrial dynamics is differentially regulated during neuronal maturation.**

We used embryonic rat cortical neurons in primary culture to evaluate the temporal changes in mitochondrial morphology during neuronal maturation. Neuronal growth was assessed by MAP2 and Beta3-tubulin immunostaining (not shown), and synaptic maturation was visualized by immuno-detection of the pre-synaptic vesicle protein synaptophysin. Synaptophysin expression started after four days *in vitro* (DIV) and accumulated until DIV12, as detected *in situ* (not shown) or by Western blot (Fig. 1C).

Confocal microscopy images of the neuronal mitochondrial network throughout maturation were obtained after immunostaining of the mitochondrial respiratory chain complexes (Fig. 1A). At all DIV, the neuronal mitochondriome was generally filamentous, with a mean mitochondrial length of  $\approx 1,2 \mu\text{m}$ . Using morphometry, we analyzed two classes of mitochondrial filaments, short (0.3 to 2  $\mu\text{m}$ ) and long (2 to 10  $\mu\text{m}$ ), over time in culture. If the ratio of long vs short mitochondria was overall constant, a transitory 3 fold increase occurred at DIV 6, due to a raise of the long population (Fig. 1B).

Mitochondrial morphology is controlled by a balance between mitochondrial fusion and fission proteins. Interestingly, some of these proteins exhibited pronounced changes in their expression during *ex vivo* neuronal maturation, as estimated by Western blot (Fig. 1C). Whereas MFN2 protein levels remained constant, levels of the long OPA1 isoform continuously increased from DIV2 to 12, while MFN1 protein levels decreased after DIV4. Furthermore, while two isoforms of DRP1 were detected in dissociated neurons before plating (DIV0), only the longer isoform was present later on. Similar changes in the expression of key regulators of mitochondrial dynamics are observed *in vivo* during cortical development, as assessed by Western blots from E17 and E20 embryos as well as from post-natal or adult cortices (Fig. 1D).

The transitory mitochondrial hyperfusion observed at DIV6 was accompanied by a transient increase in ROS levels, as assessed by spectrofluorometry using CM-H<sub>2</sub>DCFDA (Fig. 2A). Interestingly, the same time course was observed for NRF2 nuclear translocation, with a two-fold increase at DIV6 (Fig. 2B). To analyze the causal

link between ROS levels and hyperfilamentation, we pre-treated the cells with the antioxidant Trolox. Whereas this treatment reduced ROS levels by 50%, it had no effect on mitochondrial morphology at DIV6 (Fig. 2C).

## **2. OPA1 down-regulation alters mitochondrial morphology and functioning as well as neuronal maturation.**

To investigate the impact of altered mitochondrial dynamics on mitochondrial hyperfilamentation, ROS levels, and neuronal maturation, we down-regulated the expression of the pro-fusion protein OPA1 by RNA interference. Cortical neurons were transfected with siRNA against OPA1 or control siRNA before plating. At DIV6, Western blot using anti-OPA1 antibodies revealed an effective knockdown of OPA1 expression (61% +/- 8%), which led to an expected increase in fragmented mitochondria,  $<0,3\mu\text{M}$ , (72% +/- 9%) (Fig. 3A, B), without any impact on the spontaneous apoptotic neuronal death rate (not shown).

However, impairing OPA1 function did not impact the distribution of mitochondria in MAP2-stained dendrites (Fig. 3B) and Tau-stained axons (not shown). Similarly, OPA1 down-regulation did not alter the overall neuronal morphology, illustrated here by MAP2 immunostaining (Fig 3B), neither in terms of primary and secondary dendrites length nor in number (Table 1), but did result in a decreased expression of both pre-synaptic (synaptophysin and synapsin) and post-synaptic (PSD95) markers (Fig. 3A), without modification of their overall distribution (not shown).

Given the observed decreases in synaptic protein expression without apparent changes in mitochondrial distribution, we hypothesized that OPA1 knockdown might perturb mitochondrial energetics. Mitochondrial membrane potential in cortical neurons transfected with OPA1-targeting or control siRNA was estimated on DIV6 by spectrofluorometry using the JC1 probe. The ratio of red to green fluorescence revealed a  $\approx 25\%$  decrease in OPA1-depleted cells, indicating a mitochondrial

depolarization (Fig. 3C, left panel) that could reflect a reduced respiratory rate. Accordingly, a slight but significant  $\approx 15\%$  decrease in ROS levels was measured under these conditions (Fig. 3C, right panel). The diminution in respiration may have been due to lowered levels of mitochondrial respiratory chain complexes; indeed, Western blot analysis of OPA1-depleted cells showed decreased levels of representative subunits of complexes I, III and IV (35%  $\pm$  4%, 32%  $\pm$  8%, 50%  $\pm$  6%, respectively) (Fig. 3D).

## Discussion

A growing body of evidence implicates mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases (Chen and Chan, 2009). Furthermore, links emerge between mitochondrial dynamics and neuronal physiology, particularly in terms of the reciprocal regulation of synapses and mitochondria, (Li et al., 2004; Verstreken et al., 2005). On the other hand, few studies have focused on neuronal maturation and those mainly concern DRP1 which promotes mitochondrial fission (Li et al., 2008). We show here that establishment of a transitory hyperfilamentous mitochondrial network is crucial for synaptic maturation *ex vivo*, which is impaired by down-regulation of the fusogenic OPA1 protein, through oxidative metabolism alterations.

Investigating the evolution of mitochondrial morphology during neuronal maturation in primary culture, we show that the neuronal mitochondriome of cortical neurons is filamentous, in line with previous reports (Chang and Reynolds, 2006; Uo et al., 2009; Voccoli and Colombaioni, 2009). In mature primary neuronal cells, mitochondrial size has been reported to increase by 20% compared with immature cells (Chang and Reynolds, 2006). During the course of neuronal maturation *ex vivo*, our results demonstrate a transitory mitochondria hyperfilamentation: mitochondrial size increased three-fold at DIV6 (corresponding to a 50% increase in the mean size) and then

decreased beyond DIV6. This early transitory hyperfilamentation correlates with expression changes, both *ex vivo* and *in vivo*, of the fission and fusion proteins that control mitochondrial morphology. The long form of the pro-fission protein DRP1 increased over time in culture, while the short isoform was only present at the embryonic E17 stage. This pattern might be related to differential mRNA splicing, as cortical neurons have been reported to express several splice variants of DRP1, including a neuron-specific isoform that incorporates exon 3 (Uo et al., 2009), although nothing is known about their respective functions. Mitofusins behave differently during maturation, with MFN1 disappearing at DIV6 *ex vivo*, and after P1 *in vivo*, while MFN2 levels remain constant in both cases. Meanwhile, levels of the long fusogenic OPA1 isoform continuously increased from DIV 2 to 12. Because the fusogenic action of OPA1 depends critically on MFN1 (Cipolat et al., 2004), the filamentation process should be controlled by the OPA1/MFN1 ratio. Owing to the concomitant increase in the expression of the OPA1 long isoform and decrease in the expression of MFN1 at DIV6, this ratio experiments a 3 fold increase at DIV6 (not shown) and could therefore be responsible for the transient nature of this hyperfilamentation.

The general assumption is that longer filaments are beneficial for mitochondrial energy supplies, while fragmented mitochondria are more suitable for transportation. Increase in mitochondrial filamentation has been shown to precede differentiation in immortalized neuroblasts (Voccoli and Colombaioni, 2009) as well as in myoblasts (De Palma et al., 2010) and in embryonic stem cells (Wilkerson and Sankar, 2011), suggesting a broader biological significance to this phenomenon. Therefore, the transitory increase in mitochondrial filamentation that we observed at DIV6, simultaneously with the onset of synaptophysin expression, could be a specific requirement of this stage of maturation, with mitochondria later fragmenting for transportation to the remote parts of mature neurons. Interestingly, seminal work by Sheng and colleagues demonstrated that the number of mitochondria within dendritic

protrusions increased during the active period of synaptogenesis and spine development in culture, together with local mitochondrial branching and filamentation (Li et al., 2004). Furthermore, a creatinine-dependent increase in mitochondrial membrane potential has been reported to lead to an increase in the density of spines and synapses (Li et al., 2004), and ATP-dependent augmentation of synaptic activity is correlated with an increase in dendritic mitochondrial size (Chang et al., 2006). Reciprocally, impairing mitochondrial function with CCCP has been reported to lead to neuritic retraction *via* mitochondrial membrane potential drop and fragmentation (Voccoli and Colombaioni, 2009), while the increase in oxidative metabolism that accompanies mitochondrial elongation seems to be required for stem cell differentiation (Chung et al., 2007; Mandal et al., 2010). In line with these reports, both mitochondrial hyperfilamentation and synaptic markers expression are impaired in OPA1-depleted cells, together with mitochondrial functioning (see below).

RNAi-mediated knockdown of OPA1, which led to a reduced expression of pre- and post-synaptic marker proteins, had no impact on neuronal dendritic arborization (dendrite length and branching), hence on neuritogenesis, suggesting a specific role of OPA1 in synaptogenesis. Deleterious effects of OPA1 loss of function on synaptic markers could be expected given the crucial role of mitochondrial fission during the formation and maintenance of the synapse. Manipulating DRP1 *ex vivo* has been shown not to affect the pattern of dendritic arborization of primary hippocampal neurons, but effective on dendritic spines, PSD-95 clusters and synapses number (Li et al., 2004; Li et al., 2008; Wang et al., 2009). However, primary forebrain DRP1<sup>-/-</sup> neurons show both defective synapses and decreased numbers of neurites (Ishihara et al., 2009). While these studies demonstrate that DRP1 knockout perturbs synapse development by impairing the trafficking of mitochondria to neuronal processes (Li et al., 2004; Verstreken et al., 2005), our data suggest that the impact of OPA1 knockdown on synaptogenesis occurs *via* disruption of mitochondrial oxidative

metabolism. Indeed, we found that OPA1 knockdown led to reduced protein levels of the respiratory chain complexes I, III, and IV, which could be due to cristae disorganization (Olichon et al., 2003) impacting the stability and integrity of membrane-bound respiratory complexes or supra-complexes (Lenaz and Genova, 2009). Reduction of respiration was previously reported in OPA1-depleted non-neuronal cells as well as in fibroblasts from ADOA-1 patients bearing OPA1 mutations (Landes et al., 2010). This phenotype also applies to cortical neurons because OPA1 knockdown led to a decrease in mitochondrial membrane potential concomitant with a decrease in ROS levels. However, as alteration of respiratory complex functioning was proposed to induce oxidative stress in invertebrate models of ADOA-1 (Kanazawa et al., 2008; Tang et al., 2009), we cannot rule out that the decreased ROS levels we observed in OPA1-depleted neurons was the consequence of induced anti-oxidant responses. We are currently addressing this issue.

ROS are frequently viewed as metabolically toxic; however, recent works demonstrate their crucial role in signaling pathways (Hamanaka and Chandel, 2010). The modest transitory increase in ROS levels at DIV6 we identified at the onset of synaptogenesis may impinge on cell signaling, an idea in line with previous studies reporting increased ROS levels during neuronal differentiation (Tsatmali et al., 2005). At this same early stage of maturation, we report a transitory increase in the nuclear translocation of the transcription factor NRF2, depletion of which was recently shown to delay *ex vivo* neuronal differentiation (Zhao 2009). Furthermore, anti-oxidant treatment at DIV6 reduced ROS levels, but did not interfere with the transitory hyperfilamentation, indicating that the observed increase in ROS levels is downstream of the increase in mitochondrial size. Altogether, our findings suggest a transient requirement for mitochondrial hyperfilamentation during neuronal maturation leading to ROS-dependent NRF2 signaling. Thus, as has been suggested for ESCs (Mandal et al., 2010), during early neuronal maturation, mitochondria may trigger specific retrograde

signals, including activation of transcription factors, that could travel to the nucleus and modulate the transcription of specific target genes.

Finally, our findings suggest that OPA1 is required for proper mitochondrial functioning when energy needs are enhanced, e.g., for the formation and/or maintenance of synapses. Our data offer new insights not only into the impact of mitochondrial dynamics on CNS neuronal functioning, but also into the pathological processes leading to ADOA-1, as OPA1 dysfunction could impact the establishment of the synaptic connections that are required for the proper specification of adult retinal ganglion cells (RGC). Indeed, in an ADOA-1 mouse model, OPA1 mutations were shown to lead to RGC dendritic pruning and morphological changes that precede the onset of clinical visual loss and structural changes in the optic nerve in the absence of significant cell loss (Williams et al., 2010). In conclusion, unraveling the role of OPA1-dependent mitochondrial dynamics on neuronal maturation and function will be informative vis-à-vis possible therapeutics outcomes for neurodegenerative diseases.

## References

- Boldogh IR, Pon LA (2007) Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol* 17:502-510.
- Chang DT, Reynolds IJ (2006) Differences in mitochondrial movement and morphology in young and mature primary cortical neurons in culture. *Neuroscience* 141:727-736.
- Chang DT, Honick AS, Reynolds IJ (2006) Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons. *J Neurosci* 26:7035-7045.
- Chen H, Chan DC (2009) Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18:R169-176.

- Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2007) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130:548-562.
- Cheng A, Hou Y, Mattson MP (2010) Mitochondria and neuroplasticity. *ASN Neuro* 2.
- Chung S, Dzeja PP, Faustino RS, Perez-Terzic C, Behfar A, Terzic A (2007) Mitochondrial oxidative metabolism is required for the cardiac differentiation of stem cells. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 4 Suppl 1:S60-67.
- Cipolat S, de Brito OM, Dal Zilio B, Scorrano L (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15927-15932.
- De Palma C, Falcone S, Pisoni S, Cipolat S, Panzeri C, Pambianco S, Pisconti A, Allevi R, Bassi MT, Cossu G, Pozzan T, Moncada S, Scorrano L, Brunelli S, Clementi E Nitric oxide inhibition of Drp1-mediated mitochondrial fission is critical for myogenic differentiation. *Cell Death Differ* 17:1684-1696.
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquellec L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26:207-210.
- Detmer SA, Chan DC (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8:870-879.
- Hamanaka RB, Chandel NS (2010) Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci* 35:505-513.
- Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K, Otera H, Nakanishi Y, Nonaka I, Goto Y, Taguchi N, Morinaga H, Maeda M, Takayanagi R, Yokota

- S, Mihara K (2009) Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol* 11:958-966.
- Kanazawa T, Zappaterra MD, Hasegawa A, Wright AP, Newman-Smith ED, Buttle KF, McDonald K, Mannella CA, van der Blik AM (2008) The *C. elegans* Opa1 homologue EAT-3 is essential for resistance to free radicals. *PLoS Genet* 4:e1000022.
- Landes T, Leroy I, Bertholet A, Diot A, Khosrobakhsh F, Daloyau M, Davezac N, Miquel MC, Courilleau D, Guillou E, Olichon A, Lenaers G, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ, Belenguer P (2010) OPA1 (dys)functions. *Semin Cell Dev Biol* 21:593-598.
- Lenaz G, Genova ML (2009) Structural and functional organization of the mitochondrial respiratory chain: a dynamic super-assembly. *Int J Biochem Cell Biol* 41:1750-1772.
- Li H, Chen Y, Jones AF, Sanger RH, Collis LP, Flannery R, McNay EC, Yu T, Schwarzenbacher R, Bossy B, Bossy-Wetzel E, Bennett MV, Pypaert M, Hickman JA, Smith PJ, Hardwick JM, Jonas EA (2008) Bcl-xL induces Drp1-dependent synapse formation in cultured hippocampal neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:2169-2174.
- Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M (2004) The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119:873-887.
- Mandal S, Lindgren AG, Srivastava AS, Clark AT, Banerjee U (2010) Mitochondrial Function Controls Proliferation and Early Differentiation Potential of Embryonic Stem Cells. *Stem Cells*.

- Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 278:7743-7746.
- Tang S, Le PK, Tse S, Wallace DC, Huang T (2009) Heterozygous mutation of Opa1 in *Drosophila* shortens lifespan mediated through increased reactive oxygen species production. *PLoS One* 4:e4492.
- Tsatmali M, Walcott EC, Crossin KL (2005) Newborn neurons acquire high levels of reactive oxygen species and increased mitochondrial proteins upon differentiation from progenitors. *Brain Res* 1040:137-150.
- Uo T, Dworzak J, Kinoshita C, Inman DM, Kinoshita Y, Horner PJ, Morrison RS (2009) Drp1 levels constitutively regulate mitochondrial dynamics and cell survival in cortical neurons. *Exp Neurol* 218:274-285.
- Verstreken P, Ly CV, Venken KJ, Koh TW, Zhou Y, Bellen HJ (2005) Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* 47:365-378.
- Voccoli V, Colombaioni L (2009) Mitochondrial remodeling in differentiating neuroblasts. *Brain Res* 1252:15-29.
- Wang X, Su B, Lee HG, Li X, Perry G, Smith MA, Zhu X (2009) Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 29:9090-9103.
- Westermann B (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11:872-884.
- Wilkerson DC, Sankar U (2011) Mitochondria: A sulfhydryl oxidase and fission GTPase connect mitochondrial dynamics with pluripotency in embryonic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*.

Williams PA, Morgan JE, Votruba M (2010) Opa1 deficiency in a mouse model of dominant optic atrophy leads to retinal ganglion cell dendropathy. *Brain* 133:2942-2951.

Zhao [F](#), [Wu T](#), [Lau A](#), [Jiang T](#), [Huang Z](#), [Wang XJ](#), [Chen W](#), [Wong PK](#), [Zhang DD](#). (2009) Nrf2 promotes neuronal cell differentiation. [Free Radic Biol Med](#). 47:867-79.

Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM, Vance JM, Battaloglu E (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36:449-451.

## Legends to figures

### Figure 1 : Mitochondrial dynamics during neuronal maturation.

**A.** Confocal micrographs of neuronal mitochondria immunolabeled with respiratory chain antibodies (left panel) showing long mitochondria in the upper right panel and short mitochondria in the lower right panel (scale bar: 10  $\mu$ m). **B.** Quantification of mitochondrial size over time in culture: ratio of mean  $\pm$  s.e.m of long (2 to 10  $\mu$ M) vs short (0.3 to 2  $\mu$ M) mitochondria (n=3) from DIV2 to DIV12. Statistical significance was determined by ANOVA: \*p<0.05, \*\*p<0.01. **C/D.** Representative immunoblot showing the expression of various proteins *ex vivo* from DIV0 (i.e., E17) to DIV12 (**C**) and during development *in vivo* (**D**) from protein extracts from cortices dissected at embryonic days 17 (E17) and 20 (E20), at post-natal day 1 (P1), and at the adult stage (A); mitochondrial HSP60 and actin are used as standards.

**Figure 2: ROS levels during neuronal maturation.**

**A.** Quantification of ROS levels during neuronal maturation. Bars represent the mean  $\pm$  s.e.m of CM-H<sub>2</sub>DCFDA fluorescence values at all DIV in one representative experiment (five culture dishes) out of five experiments (AU: arbitrary units; ANOVA, \*\* $p < 0.01$ ) **B.** Nuclear translocation of the transcription factor NRF2 was estimated by immunostaining at DIV 4, 6 and 8 (n=4) and represented in percentages of variation after normalization to DIV4 values. **C.** Effect of Trolox anti-oxidant treatment (100 $\mu$ M, 6hr) at DIV6 on ROS levels (left panel; mean  $\pm$  s.e.m.; n=3) and on mitochondrial size (right panel; mean  $\pm$  s.e.m.; n=3).

**Figure 3: Effect of OPA1 down-regulation on neuronal maturation and mitochondrial morphology and function.**

**A.** Representative immunoblot showing the effect of OPA1 knockdown (upper bands) on the expression of various proteins, with the histogram representing the expression of the synaptic proteins relative to actin, normalized to control values (AU: Arbitrary Units; mean  $\pm$  s.e.m, n=6). **B.** Fluorescence micrographs (scale bars: 10  $\mu$ m) of MitoDsRed2-labeled mitochondria (red) in Map2-immunostained neurons (green). Nuclei were DAPI-labeled (blue). Histograms represent the percentage of cells with filamentous or punctuate mitochondria (mean  $\pm$  s.e.m., n=6). **C.** Quantification of JC1-based mitochondrial membrane potential (590/525 nm ratio) and neuronal ROS levels upon OPA1 knockdown, normalized to control values (AU: Arbitrary Units; mean  $\pm$  s.e.m.; n=6). **D.** Representative immunoblot showing the effect of OPA1 knockdown on the levels of five mitochondrial respiratory protein complexes (CI to CV), with the histogram representing the expression the complexes relative to HSP60 levels, normalized to control values (mean  $\pm$  s.e.m.; n=6).

Figure 1

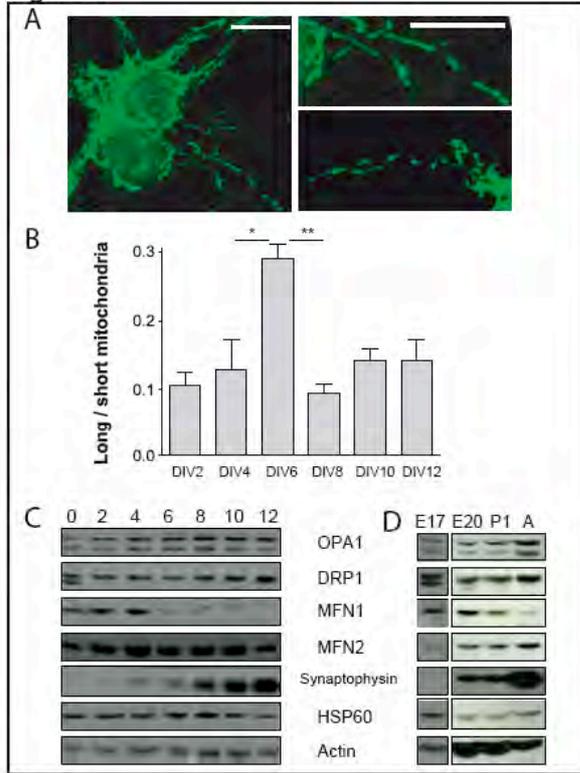


Figure 2

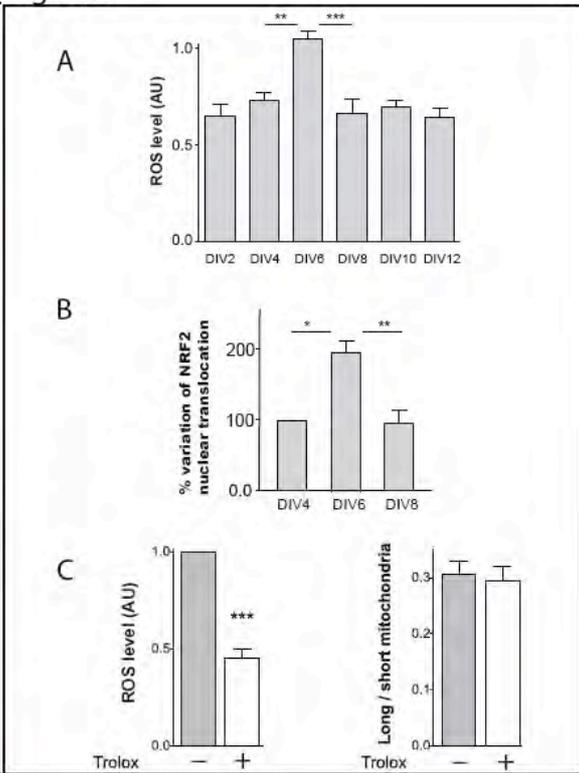


Table 1: Effect of OPA1 extinction on dendritic arborization

Repartition in classes		Dendrites size				Dendrites number		
		<17 $\mu$ m	17-34 $\mu$ m	34-51 $\mu$ m	>51 $\mu$ m	<4	5 to 7	>8
Primary dendrites	siCtrl	12 % +/- 4	48 % +/-12	28 % +/-8	12 % +/-8	14 % +/-9	53 % +/-4	33 % +/-6
	siOPA	11 % +/-6	36 % +/-9	36 % +/-9	17 % +/-6	1 % +/-1	66 % +/-14	33 % +/-14
						<2	3 to 5	>6
Secondary dendrites	siCtrl	44 % +/- 8	43 % +/-4	12 % +/-4	1 % +/-0.5	15 % +/-9	61 % +/-10	24 % +/-14
	siOPA	37 % +/-13	50 % +/-8	11 % +/-6	3 % +/-1.5	21 % +/-6	57 % +/-12	22 % +/-17

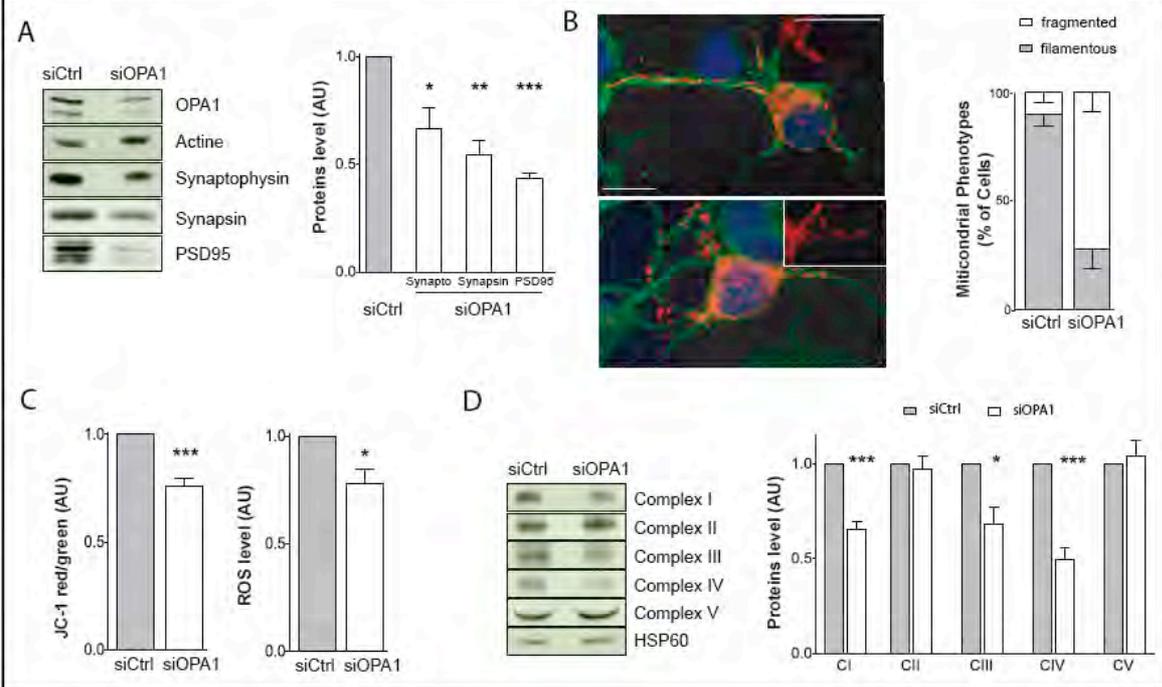


Figure 3

**AUTHOR :** BERTHOLET Ambre Marguerite Solange

**TITLE :** Impact of the mitochondrial fusion protein OPA1 on neuronal oxidative metabolism and synaptic transmission.

**ABSTRACT :**

In the past few years, multiple findings have suggested that disruptions of mitochondrial functions and dynamics contribute to neurodegenerative diseases. Mitochondrial functions in neurons include regulation of calcium and redox signaling, developmental and synaptic plasticity as well as the arbitration of cell survival and death. Mitochondrial dynamics controls the organelle's morphology *via* a delicate balance of two opposing forces: mitochondrial fusion and fission that are regulated by large dynamin-related GTPases evolutionary conserved from yeast to human. We have previously demonstrated that the fusion protein OPA1 loss or mutations led to mitochondrial inner membrane dysfunctions and apoptosis of particular importance in optic nerve pathologies like ADOA1 (autosomal dominant optic atrophy). While links emerge between defects in mitochondrial fusion and neurodegeneration, the processes involved are still largely unknown.

To understand the mechanisms by which alterations of mitochondrial dynamics could contribute to mitochondria dysfunction, eventually leading to neurodegeneration, we studied the effects of OPA1 loss of function in neurons *ex vivo*. In cortical neurons, RNA interference of the fusion protein OPA1 led to mitochondrial fragmentation without altering neither mitochondrial distribution nor neuronal death rate. While there was no incidence on dendrites and axon size and numbers, the quantity of several synaptic proteins was reduced, suggesting synaptic impairment. In these conditions, the redox state of OPA1 depleted-neurons was impaired and specific respiratory complex proteins quantities were decreased. Finally, electrophysiological recordings showed that OPA1 depletion induced changes in synaptic transmission, particularly in decreasing of EPSC frequency and by increasing IPSC frequency. Interestingly, forskolin treatment rescue these electrophysiological defaults.

In conclusion, our data may offer new insights not only into mitochondrial dynamics-linked neurodegenerative diseases like ADOA1 but to other neurodegenerative pathologies correlated with oxidative metabolism such as Huntington's, Parkinson's and Alzheimer's diseases.

**KEYWORDS :** Mitochondrial dynamics, OPA1, oxidative metabolism, neuron, synaptic transmission

AUTEUR : BERTHOLET Ambre Marguerite Solange

TITRE : Influence de la protéine de fusion mitochondriale OPA1 sur le métabolisme oxydatif et la transmission synaptique

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : 28 Octobre 2011, salle de conseil de l'IBCG

## RESUME

Depuis quelques années, de nombreux travaux suggèrent que des perturbations des fonctions mitochondriales contribuent aux maladies neurodégénératives. Les mitochondries sont particulièrement importantes pour les neurones en raison à leur rôle dans la régulation calcique, la signalisation redox, la plasticité synaptique et, *in fine*, la survie cellulaire. La dynamique mitochondriale contrôle la morphologie de l'organelle via un équilibre délicat entre deux forces opposées : la fusion et la fission régulées par des dynamines de la grande famille des GTPases. Notre équipe a montré que la perte ou des mutations de la protéine de fusion OPA1 entraînent des dysfonctionnements de la membrane interne mitochondriale pouvant mener à l'apoptose, qui revêtent une importance particulière dans l'atrophie optique autosomale dominante (ADOA-1).

Pour comprendre les mécanismes par lesquels des altérations de la dynamique mitochondriale pourraient contribuer à des dysfonctionnements mitochondriaux et éventuellement à l'origine de la neurodégénérescence, nous avons étudié les effets de la perte d'OPA1 dans des neurones corticaux *ex vivo*. La perte de fonction à l'interférence à l'ARN mène à la fragmentation mitochondriale sans perturbation de la distribution mitochondriale, ni mort neuronale. Si l'arborescence dendritique est inchangée, la quantité de plusieurs protéines synaptiques est réduite, suggérant une déficience synaptique. De plus, dans ces conditions, l'état redox est altéré et la quantité protéique de complexes respiratoires spécifiques est réduite. Enfin, l'enregistrement des propriétés électrophysiologiques montrent des changements dans la transmission synaptique, notamment par une diminution de la fréquence des courants excitateurs et une augmentation de la fréquence des courants inhibiteurs. De façon intéressante, un traitement à la forskoline permet de restaurer un fonctionnement électrophysiologique normal.

Pour conclure, nos données offrent de nouvelles pistes non seulement dans la compréhension de maladies neurodégénératives liées directement à la dynamique mitochondriale comme l'ADOA1, mais aussi d'autres pathologies neurodégénératives liées à un défaut du métabolisme oxydatif comme les maladies d'Alzheimer, Parkinson ou Huntington.

MOTS-CLEFS : Dynamique mitochondriale, OPA1, métabolisme oxydatif, neurone, transmission synaptique

DISCIPLINE : Neurobiologie cellulaire

ADRESSE DU LABORATOIRE : Université Paul Sabatier – CNRS UMR5547, IFR109  
118, route de Narbonne 31062 TOULOUSE