



HAL
open science

Décryptage du rôle du gène *Hacd1* dans le fonctionnement mitochondrial et musculaire

Aymeline Vandestienne-Ratnam

► **To cite this version:**

Aymeline Vandestienne-Ratnam. Décryptage du rôle du gène *Hacd1* dans le fonctionnement mitochondrial et musculaire. Génétique animale. Université Paris-Est Créteil Val-de-Marne - Paris 12, 2021. Français. ⟨NNT : 2021PA120002⟩. ⟨tel-04022917⟩

HAL Id: tel-04022917

<https://theses.hal.science/tel-04022917v1>

Submitted on 10 Mar 2023

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

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



HAL Authorization



Université Paris-Est Créteil
École doctorale « Science de la vie et de la santé »
Spécialité « Biologie cellulaire »

Thèse de doctorat par
Aymeline VANDESTIENNE-RATNAM
en vue d'obtenir le grade de
docteur de l'Université Paris-Est Créteil

Décryptage du rôle du gène *Hacd1*
dans le fonctionnement
mitochondrial et musculaire

Thèse dirigée par la Pr Fanny PILOT-STORCK et le Pr Laurent TIRET

Soutenue le 08 avril 2021

En présence des membres du jury :

Dr Carina PRIP-BUUS, rapportrice

Dr Athanassia SOTIROPOULOS, rapportrice

Dr Rémi MOUNIER, examinateur

Dr Rodrigue ROSSIGNOL, examinateur

REMERCIEMENTS

Je tiens à grandement remercier mesdames et messieurs les membres du jury, pour l'honneur qu'ils me font de lire ma thèse et d'assister à la présentation de mon travail, fruit de quatre années et demie de labeur, mais aussi d'émerveillement et de découverte.

Je tiens à remercier Frédéric Relaix, qui m'a accueillie dans son équipe et sans qui je n'aurais pas pu mener à bien tant d'expériences. Je remercie mes directeurs de thèse, Fanny et Laurent. Une thèse est une aventure houleuse, mais même si le chemin parcouru n'était pas celui tracé sur la carte, notre frêle esquif a su se frayer un chemin à travers les ouragans et nous voilà arrivés sur l'Île aux trésors. Fanny, merci de m'avoir guidée vers plus d'autonomie, tout en me transmettant tes « trucs et astuces », un savoir presque « druidesque » et une façon de penser qui me suivra dans ma carrière. Laurent, merci d'être arrivé ce jour-là dans mon cours en retard, sans présentation et de m'avoir fait comprendre ce que c'était qu'être passionné par ce que l'on fait ! Tes idées parfois surprenantes voire abracadabrantesques nous ont amenés à d'étonnantes discussions scientifiques, mais si enrichissantes ! Merci et bravo à tous les deux d'avoir su composer avec mon sale caractère et de m'avoir menée jusqu'ici.

Merci à l'équipe de Neurobio, Isabel pour tes conseils accompagnés de ces fous-rires dont tu as le secret – et ton succulent *carrot cake* ; Nicolas et Carole, pour toutes ces discussions passionnées et passionnantes ; Inès, qui m'a permis de compléter ma petite famille avec Ruby (alias Neela), ainsi que Xavier, Hans et toute l'équipe des soigneurs. Ce n'est pas parce que nous n'étions pas de la même équipe que nous n'avons pas su nous constituer notre petite famille ! Merci d'avoir été là.

Laurent G., « Lolo », tu as été un vrai repère dans ce labo, de bon conseil et un super soutien quand le moral était un peu bas. Tu es un peu la mémoire de notre équipe, alors je compte sur toi pour ne garder que mes bons côtés et oublier mes bavardages et mes éternelles râleries !

Diana et Camille, merci pour votre soutien dans les manip, mais aussi moralement... j'ai tellement appris auprès de vous, vous êtes des perles, ne changez jamais ! Merci d'avoir su prendre soin de mes bébés, de mon Charles et des autres. Camille, une petite pensée supplémentaire pour toi, tu as un cœur immense, cette thèse aurait vraiment été différente sans toi ! Chaque heure passée avec toi est une heure pleine de rire, de sourire et de travail dans la bonne humeur... vous me manquez les filles !

JD, Loïc, Mélody, mille fois désolée de vous avoir tant perturbé dans votre dur travail !!! Que dire de notre bureau ?! Je l'ai vécu comme un lieu de Savoir, avec un grand S, quel que soit le sujet ! Un lieu au temps des Lumières, où la parole de chacun avait sa place et où on jaillit tat de belles idées... et de sacrés fou-rires ! Merci à tous les trois d'avoir été là. JD, pour tes astuces sur les logiciels et ton humour tordant ! Loïc, pour ton esprit critique sans faille... j'ai enfin trouvé mon maître en termes de blablatage et dire qu'il m'a fallu une thèse pour ça !

Mélody, je te remercie de m'avoir supportée, je sais que je n'ai pas un caractère facile, assez difficile à appréhender et tu as eu le privilège de le savourer bien plus que les autres ! Merci milles fois pour la découverte de tes petites levures, source d'émerveillement quotidien et qui ont vraiment ravivé une flamme en moi... je te souhaite tout le meilleur sur notre beau projet et je ne pourrais jamais t'exprimer le plaisir que j'ai eu à travailler avec toi, même ces quelques mois, dans un esprit de partage scientifique réciproque, un vrai bonheur ! Tu es une très belle personne, c'était une chance d'avoir pu te rencontrer et échanger avec toi.

Alex, je ne trouve même pas les mots... qu'aurait été ce projet sans toi ? J'ai trouvé en toi plus qu'un grand frère de la Science, j'ai trouvé un mentor. Et j'espère que cette thèse sera à la hauteur ! Merci d'être cette personne insatiable de découverte et de connaissance, imaginatif, créatif, toujours en ébullition, en deux mots, ce scientifique accompli. Merci surtout d'avoir doublé ce trait de caractère par une qualité humaine hors normes, une sensibilité et un calme qui font de toi cette personne extraordinaire... Merci pour ces manip complètement folles, avec parfois des gros pêtages de câble dont tu as le secret, mais que nous avons toujours menées jusqu'au bout. Merci de m'avoir fait découvrir ce monde merveilleux de la mito, cette communauté extraordinaire, ces gens qui sont à ton image, gentils, drôles, mais si calés. Tu seras – pardon, tu es déjà – un grand chef, de ceux qui ont des idées brillantes mais qui n'en oublient pas d'écouter les gens de leur équipe. Tu sais faire ressortir le meilleur de chacun et c'est une force qui ne te quittera pas. Ces mots sont très désorganisés, mais c'est tellement difficile de te remercier, je n'arrive pas à synthétiser tout ce que tu m'as apporté. Le côté « sioux », les astuces, un peu de ta façon de penser, merci d'avoir partagé tout cela. T'avoir rencontré est une chance inestimable. Merci d'être cet humain doublé d'un excellent scientifique.

Nahed, ma sœur, mon « evil twin ». Tu auras sans doute le plus court de tous les remerciements. Pourquoi ? Car tu sais déjà tout... et que ce que je ressens pour toi ne tient qu'en deux petits mots : je t'aime. Tu sais à quel point ta présence a été une bouffée d'oxygène pour moi. Merci d'avoir été ce petit poussin qui me précédait au moment où je prends mon envol. Youssef, une pensée pour toi qui a dû supporter deux « chiantes », mais toujours en relativisant et en nous soutenant !

Guillaume, mon frerot. Je ne peux rien t'exprimer que tu ne sais déjà. Merci d'avoir rendu légers des moments durs et graves. Merci de ta présence qui était à elle seule une raison de sourire. Tout simplement, merci d'être la merveilleuse personne que tu es, merci d'être mon frère et de m'avoir fait connaître Papy et Mamy. Ambre, tu as toujours été l'oreille attentive et compatissante dont j'ai eu besoin à certaines périodes très difficiles et toujours avec cette douceur qui t'es propre... nos petits « Tea time » me manquent !

Thomas, je ne serais littéralement pas ici sans toi. Ce doit être un syndrome de Stockholm, car cela fait de toi un de mes bourreaux, mais je ne pourrais jamais assez te remercier des choix que tu m'as aidés à prendre dans ma vie. Je suis une vraie chanceuse, car ce n'est pas donné à tout le monde d'avoir un ami comme toi. Tu m'as élevée moralement, scientifiquement,

artistiquement et contribuer à faire de moi une meilleure version de moi-même. Merci, merci pour tout.

Ma chère Gaëlle, que d'étapes traversées ensemble !!! Qui aurait pu dire que je trouverais un ange sur cette Terre ? Merci d'être cet Être de lumière pour moi. Ton soutien discret et constant a été ma force. Tu es de ces personnes qui nous régénèrent et nous consolent sans rien faire, rien qu'en pensant à toi. Une personne clé de ma vie, une grande sœur. L'Ecosse, mon pays de cœur, ne le serais sans doute pas devenu sans toi. Il me tarde que nous y retournions, comme en pèlerinage. Tu m'as soutenue dans des choix qui n'ont pas toujours été faciles, consolée, aimée... et sans jamais me juger. Merci d'avoir toujours été là. Mes sentiments dépassent mes mots...

Papa, Maman, vous m'avez toujours appris que je ne travaille que pour moi... hé bien, je me suis gâtée ! Que d'étapes franchies ! Vous êtes formidables, car s'il est très difficile de soutenir son enfant quand on pense qu'il fait le bon choix, ça l'est encore plus quand on pense qu'il en fait un mauvais ! Et vous m'avez quand même soutenue. Je crois que c'est ça, être parents. Merci de m'avoir fait comprendre cette leçon. Vous m'avez tous les deux appris à me surpasser, chacun à votre façon. Je vous le dis rarement, peut-être même ne vous l'ai-je jamais dit depuis que je ne suis plus enfant – les enfants sont tellement plus intelligents que nous ! -, alors je pense qu'une thèse est le meilleur moment pour le formuler : vous êtes des parents extraordinaires. Mon plus grand souhait est de réussir, comme vous, à mener mes enfants là où ils le voudront. Je vous aime.

Coralie, je ne saurais dire à quel moment je suis passé de « peste » à une vraie grande sœur... mais ce qui est sûr, c'est que la relation que j'ai avec toi aujourd'hui est la plus parfaite qu'une sœur puisse rêver d'avoir. Merci d'avoir su contrebalancer ma folle personnalité et d'aujourd'hui avoir cette maturité de réflexion sur la vie qui me donne à chaque fois le vertige... ce que ma petite sœur est grande et sage ! Merci de ces enseignements de vie que tu me délivres à chaque fois avec une candeur et une fraîcheur qui te sont propres, ces enseignements qui doucement infusent en moi, qui résonnent chaque jour plus fort et que je me surprends bien souvent à me répéter.

Kathleen, tu en doutes souvent, mais tu as été un vrai cadeau dans nos vies et nous t'aimons plus que tout – même si tu connais notre côté prude et notre manque de démonstrativité à ce niveau. J'ai bien souvent pensé à toi pendant cette thèse... combien de fois le souvenir de nos moments passés ensemble m'ont faits rire ! Merci pour les bonhommes de neige avec des poils, pour tes chants endiablés qui te faisaient tourner à en perdre l'équilibre et bien sûr, merci de m'avoir choisie pour partager ce moment magique de ta vie qu'était ta rencontre avec les BTS ! Je crois en toi. Tu as une force que tu ne soupçonnes même pas.

Mamie, Grand-mère : le seul regret que j'ai aujourd'hui, c'est que vous ne soyez pas là pour me voir. Merci de m'avoir construite, de m'avoir permise de devenir la femme accomplie qui sera bientôt docteur. Mamie, nul doute que tu serais venue avec un beau chapeau et une fierté sans faille. Grand-mère, toi qui a un jour dit à une petite fille de 10 ans que nous étions éternels par nos gènes, vois où cela m'a menée : à travers le Magistère Européen de Génétique

jusqu'à une thèse sur les mitochondries... merci, car si tu m'as façonnée par tes mots sages et savants, tu m'as offert une chose inestimable : tes mitochondries. C'est à vous deux que je veux dédier cette thèse.

Je remercie très chaleureusement ma belle-famille, Amma et Appa, pour m'avoir accueillie et je dirais même adoptée au sein de votre famille, malgré les regards et les paroles de certains. Je suis fière de pouvoir dire que j'appartiens aussi à la famille Ratnam. Nicolas, tu es un beau-frère dont tout le monde rêverait : merci de tout ce que tu as toujours fait, que ce soit pour Laurent ou pour moi. Gasthuri, ma chère belle-sœur et Julie, ma petite nièce adorée, merci de m'avoir fait oublier les durs moments de la thèse lors de folles journées en famille !

On sous-estime trop souvent l'importance des animaux dans nos vies : je profite donc de ces remerciements pour adresser une pensée à tous les animaux de laboratoire, notamment à mes petites pépètes, qui ont permis l'élaboration des sciences vétérinaires et nous permettent encore de trouver chaque jour de nouveaux remèdes.

Merci à mes trésors, qui donnent de l'amour sans jamais compter et qui me ressourcent dans mes moments de fragilités, de doute, de déception, d'angoisse : une pensée reconnaissante à mes bébés Tiger « Bébé Tigguy », Foxie « Fox », « l'amour de ma vie » et Neela, « mon lapin ».

Enfin, la bavarde que je suis finira ces remerciements en s'adressant à la personne qui aurait mérité de partager le titre de docteur avec moi, tant tu as dû te coltiner mes histoires de mitos. La seule personne qui n'a pas fait de thèse, mais qui l'a vécu comme si c'était la sienne, qui s'est impliquée corps et âme dedans. La personne la plus merveilleuse du monde, yen kadhala, yen Purushan : toi, mon Laurent. Cette incroyable aventure, c'est main dans la main que nous la finissons. Pourtant, c'est bien à bout de bras que tu m'as hissée jusque-là. Que tu m'as soutenue. Que tu m'as encouragée. Merci de cet Amour sans faille, indescriptible, que personne ne peut comprendre tant qu'il ne l'a pas expérimenté. Cette force incommensurable que tu as, que tu me transmets à chaque instant, c'est la plus belle chose que j'ai obtenue pendant ma thèse. Si chacune des personnes citées précédemment m'a aidé à devenir une meilleure version de moi-même, tu en es le catalyseur. Merci d'avoir été à mes côtés dans cette aventure qui nous a tant rapprochée... je pourrais t'écrire des milliers de pages, alors je conclurais sur quelques mots : cette vie avec toi est extraordinaire, hâte de vivre les six prochaines ! Je t'aime infiniment et éternellement.

RESUME

La déficience du gène *HACD1* cause une myopathie chez le Chien et l'humain, caractérisée par une hypotrophie et une faiblesse musculaire. *HACD1* est une enzyme impliquée dans l'élongation des acides gras à très longue chaîne. Exprimée dans les muscles squelettiques, *HACD1* permet une optimisation de la composition lipidique de la membrane des myoblastes lors de leur fusion. Dans le cadre de ma thèse, nous avons mis en évidence que les souris invalidées pour *Hacd1* (*Hacd1*-KO) présentent une diminution du couplage mitochondrial par défaut de cardiolipine, à l'origine d'une protection contre l'obésité. Les muscles de ces souris présentent de plus une fragmentation du réseau mitochondrial. La dynamique de ce réseau étant liée à l'efficacité mitochondriale, nous avons exploré les mécanismes conduisant à la fragmentation. Nous avons observé que les protéines de la fusion et de la fission sont exprimées normalement, mais que la rigidité de la membrane mitochondriale externe est augmentée, ce qui pourrait entraver la fusion. Probablement, la fragmentation découlerait d'un défaut de composition lipidique des membranes mitochondriales. En parallèle, nous avons cherché à découpler les perturbations métaboliques et développementales des souris *Hacd1*-KO pour envisager une stratégie de traitement des désordres métaboliques. Enfin, nous avons essayé de contrecarrer la myopathie des souris *Hacd1*-KO par deux stratégies génétiques de modulation des membranes. La première, thérapeutique dans d'autres modèles de myopathies congénitales, visait une diminution de la protéine DNM2. La seconde visait une diminution de la tétraspanine Cd9. Seule cette dernière a permis d'améliorer les performances des souris *Hacd1*-KO.

Mots clés : Myopathie congénitale, Acides gras à très longue chaîne, Muscle squelettique, Mitochondrie, Membrane, Cardiolipine, Découplage mitochondrial, Métabolisme énergétique, Morphologie mitochondriale, Dynamique mitochondriale

ABSTRACT

Role of *Hacd1* in muscle and mitochondrial function

In dogs and humans, a mutation in the *HACD1* gene leads to a myopathy, characterized by muscle weakness and atrophy. The *Hacd1* gene code for an enzyme implicated in the elongation of very long chain fatty acids, and its expression in skeletal muscles optimizes the lipid composition of sarcolemma during myoblast fusion. During my PhD, we showed that knockout mice for *Hacd1* (*Hacd1*-KO) display a reduction of mitochondrial coupling due to a decrease in cardiolipin content, leading to a protection against high-fat diet-induced obesity. Muscle fibres of *Hacd1*-KO mice also have a fragmented mitochondrial network. As mitochondrial dynamics is linked to mitochondrial efficiency, we aimed to unravel the mechanisms causing fragmentation. We showed that major proteins involved in fusion and fission have a normal expression level, but also revealed a more rigid outer mitochondrial membrane. The fragmentation is thus very likely due to a primitive defect of mitochondrial membranes lipid composition. In parallel, we have sought to dissociate metabolic and developmental alterations in *Hacd1*-KO mice in order to consider a strategy for the treatment of metabolic disorders. Finally, we tried to counteract myopathy in *Hacd1*-KO mice by two genetic strategies of membrane modulation. The first, which proved therapeutic in other models of congenital myopathies, aimed at reducing the DNM2 protein content. The second aimed at lowering the tetraspanin Cd9. Only the latter improved the performance of *Hacd1*-KO mice.

Key words: Congenital myopathy, Very long chain fatty acids, Skeletal muscle, Mitochondria, Membranes, Cardiolipin, Mitochondrial uncoupling, Energetic metabolism, Mitochondrial morphology, Mitochondrial dynamics

COMMUNICATIONS ECRITES ET ORALES

Présentation de posters :

- 2016 :** - European Muscle Conference, 2-6 septembre 2016, Montpellier (France)
- 2nd International Meeting of Building the Cell, 28-30 septembre 2016, Paris (France)
- 1ère journée thématique « Remodelage mitochondrial et transition énergétique », réseau Meetocondrie, 11 octobre 2016, Paris (France)
- Automnales du GRRC « La mitochondrie », 30 novembre-2 décembre 2016, Pornichet-La Baule (France)
- 2017 :** - 9ème colloque Meetocondrie, 14-17 mai 2017, Hössegor (France)
- Colloque des Jeunes Chercheurs de l'AFM, 23 juin 2017, Paris (France)
- Journée de la recherche à l'EnvA, 27 juin 2017, Maisons-Alfort (France)
- Journée Sciences de la Vie de Créteil 2017, 4 octobre 2017, Paris (France)
- Congrès de la SFM, 22-24 novembre 2017, Colmar (France)
- 2018 :** - Emerging Concepts in Mitochondria Biology, 4-8 février 2018, Rehovot (Israël)
- Colloque Meetocondrie, 27-30 mai 2018, Pornichet (France)
- Journée Sciences de la Vie de Créteil 2018, 10 octobre 2018, Paris (France)
- 2019 :** - Congrès Myology 2019, 25-28 mars 2019, Bordeaux (France)
- 2ème journée thématique « Mitochondrie, cible thérapeutique », réseau Meetocondrie, 6 septembre 2019, Paris (France)
- Journée Sciences de la Vie de Créteil 2019, 9 octobre 2019, Paris (France)

Présentation orales :

- 2018 :** - Journée des doctorants de l'EnvA, 5 juin 2018, Maisons-Alfort (France)
- 2019 :** - Retraite scientifique BNMS, 8-9 juillet 2019, Maisons-Alfort (France)

Formations :

2016 : - Formation à l'expérimentation animale niveau I, 19-23 septembre 2016, Maisons-Alfort (France)

2017 : - Valorisation professionnelle et management de projets innovants, 25 avril-3 mai 2017, Créteil (France)

2020 : - « Stress et résilience de l'animal de laboratoire », 01 juillet 2020 (en ligne)
- « Communiquer sur l'expérimentation animale », 17 septembre 2020 (en ligne)

LISTE DES SIGLES ET ACRONYMES

AAV : *adeno-associated virus*, virus adéno-associés
acétylCoA : acétyl coenzyme A
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNg : ADN génomique
ADNmt : ADN mitochondrial
ADP : adénosine diphosphate
AGLC : acide gras à longue chaîne
AGTLC : acide gras à très longue chaîne
AMPK : *AMP-activated protein kinase*
ARN : acide ribonucléique
ARNm : ARN messenger
ASO : *antisense oligonucleotide*, oligonucléotides antisens
ATP : adénosine triphosphate
BAR : *Bin/Amphiphysin/Rys*
BIN1 : amphiphysine 2
CEC : couplage excitation-contraction
CL : *cardiolipin*, cardiolipide
CNM : *centronuclear myopathy*, myopathies centronucléaires
COX : cytochrome c oxydase
CPEO : *chronic progressive external ophthalmoplegia*, ophtalmoplégie
CPT1 : *carnitine palmitoyltransferase 1*
CPT2 : *carnitine palmitoyltransferase 2*
CR : chaîne respiratoire
CRISPR-cas9 : (*clustered regularly interspaced short palindromic repeats*)-related CRISPR-associated protein 9
CS : *contact sites*, sites de contact
DAG : diacylglycérol
DNM2 : *dynamin 2*
DRP1 : *dynamin-related protein 1*
ELOVL : *elongation of very long chain fatty acids*
ERR : *estrogen-related receptor*
FAD : flavine adénine dinucléotide
FAS : *fatty acid synthase*
FGF-21 : *fibroblast growth factor 21*
FIS1 : *fission 1*
GDF-15 : *growth differentiation factor 15*
HACD1 : 3-hydroxyacylCo-A déshydratase 1
HACD1-d5 : *HACD1 isoform, deleted in exon 5*
HACD1-fl : *HACD1 isoform, full-length*
HMLR : *hereditary myopathy of Labrador retriever*, myopathie héréditaire du Labrador retriever
IMM : *inner mitochondrial membrane*, membrane interne mitochondriale
IMS : *intermembrane space*, espace intermembranaire
KAR : 3-ketoacyl-CoA réductase
KO : *knock-out*, invalidée pour le gène
LPC : lysophosphatidylcholine

MAM : *mitochondria-associated membranes*
MET : microscopie électronique à transmission
MFF : *mitochondrial fission factor*
MFN : mitofusines
MICOS : *mitochondrial contact site and cristae organizing system*
mitoPLD : *mitochondrial phospholipase D*
MRF : *myogenic Regulatory Factors*
MTM1 : myotubularine
MTP-31, SS-31 ou Bendavia : Élamiprétide
MUFA : *Mono-unsaturated fatty acid*, acide gras mono-insaturé
MYF5 : *myogenic factor 5*
MYHC7 : *myosin heavy-chain 7*, chaîne lourde de la myosine cardiaque
MYOD : *myoblast determination protein*
NAD⁺ : *nicotinamide adenine dinucleotide*
NADP⁺ : *nicotinamide adenine dinucleotide phosphate*
NMJ : *neuromuscular junction*, jonction neuromusculaire
NRF1 : *nuclear respiratory factor 1*
OMM : *outer mitochondrial membrane*, membrane externe de la mitochondrie
OPA1 : *optical-Atrophy 1*
PA : *phosphatidic acid*, acide phosphatidique
PAX3 : *paired-box protein 3*
PAX7 : *paired-box protein 7*
PC : phosphatidycholine
PDC : *pyruvate dehydrogenase complex*, complexe pyruvate déshydrogénase
PE : phosphatidyléthanolamine
PG : phosphatidylglycérol
PGC1 : *peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) coactivator-1*
PIP2 : phosphatidylinositol (4,5) biphosphate
PPAR : *peroxisome proliferator-activated receptor*
PS : phosphatidylserine
PTPLA : *protein tyrosine phosphatase-like A*
RE : réticulum endoplasmique
ROS : *reactive oxygen species*, espèces réactives de l'oxygène
RS : réticulum sarcoplasmique
SDH : succinate déshydrogénase
shRNA : *short-hairpin RNA*
SINE : *short interspersed nuclear element*
TCA : *tricarboxylic acid cycle*, cycle de l'acide citrique (ou cycle de Krebs)
TER : 2,3-trans-enoylCoA réductase
TFAM : *mitochondrial transcription factor A*
TIM : *translocase of inner membrane*, translocase de l'IMM
TOM : *translocase of outer membrane*, translocase de l'OMM
TTN : titine
Tubule T : tubule transverse
UCP : *uncoupling proteins*
VDAC : *voltage-dependant anionic channel*, canal anionique voltage-dépendant
XLMTM : *X-linked myotubular myopathy*, myopathie myotubulaire liée à l'X

TABLE DES MATIERES

Remerciements	1
Résumé	7
Abstract.....	9
Communications écrites et orales	11
Liste des sigles et acronymes.....	15
Table des matières	19
Table des figures.....	23
Introduction	27
1. <i>HACDI</i> , un gène du développement postnatal et de l'homéostasie du muscle squelettique.....	27
1.1. La perte de fonction du gène <i>HACDI</i> chez le chien et l'humain induit une myopathie congénitale	27
1.2. <i>HACD1</i> est une enzyme impliquée dans la synthèse des acides gras.....	33
1.3. Génération d'un modèle murin <i>Hacd1</i> -KO pour l'analyse des mécanismes pathogènes et l'évaluation de méthodes thérapeutiques	37
1.4. <i>HACD1</i> contribue au développement musculaire	39
2. Le muscle squelettique, un organe consommateur et producteur d'énergie.....	49
2.1. Le muscle squelettique est un des principaux organes consommateurs d'énergie de l'organisme	49
2.2. Le glucose et les acides gras sont les comburants énergétiques du muscle	49
2.3. L'apport énergétique s'adapte en fonction de l'effort grâce aux mitochondries	53
2.4. Le muscle est organisé de manière optimale pour produire de l'énergie	57
3. La mitochondrie, organite central du métabolisme énergétique.....	63
3.1. La structure de la mitochondrie, support de son activité	63
3.2. La composition des membranes mitochondriales, élément clé de leurs propriétés	67
3.3. La mitochondrie est essentielle à la production d'énergie cellulaire	73
4. Les mitochondries potentialisent la production énergétique en s'organisant en un réseau dynamique	81

4.1. La dynamique mitochondriale permet l'adaptation à l'environnement cellulaire et aux besoins énergétiques de l'organisme.....	81
4.2. Les différents niveaux de régulation de la dynamique mitochondriale ..	85
5. Stratégies thérapeutiques innovantes pour soigner les CNMs et les maladies mitochondriales	95
5.1. Myopathies congénitales avec hypotrophie	95
5.2. Les myopathies mitochondriales.....	109
Objectifs de thèse.....	115
Matériel et méthodes	117
Résultats.....	137
CHAPITRE 1 : Rôle des gènes <i>Hacd</i> dans le développement et la fonction mitochondriale	137
Publication 1: <i>Hacd2</i> deficiency leads to early and lethal mitochondrial disease, <i>to be submitted</i>	139
Publication 2 : <i>Hacd2</i> deficiency in mice causes ichthyosis and atrophy of sebaceous glands, <i>to be submitted</i>	203
Publication 3: Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle, <i>Science Advances</i> , January 1st 2021	241
Résultats 1 : Réponse aux reviewers sur le papier Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle	289
Résultats 2 : Morphologie du réseau mitochondrial en l'absence d' <i>Hacd1</i> ...	293
CHAPITRE 2 : Découplage entre le phénotype développemental et le phénotype métabolique chez les souris <i>Hacd1</i> -KO	307
Résultats 3 : Invalidation génétique à l'âge adulte du gène <i>Hacd1</i> par l'utilisation d'un allèle de recombinaison conditionnelle.....	311
Résultats 4 : Invalidation du gène <i>Hacd1</i> à l'âge adulte par l'utilisation d'une stratégie AAV – expérience pilote avec injection intramusculaire	319
CHAPITRE 3 : Exploration de la correction de la myopathie liée à la délétion d' <i>Hacd1</i> par modulation génétique	325
Résultats 5 : Exploration de la correction de la myopathie liée à <i>Hacd1</i> par modulation de l'expression du gène <i>Dnm2</i>	329
Résultats 6 : Exploration de la correction de l'hypotrophie musculaire liée à la délétion d' <i>Hacd1</i> par la mutation de <i>Cd9</i>	343
Discussion.....	347
Les gènes <i>Hacd</i> sont essentiels pour la physiologie mitochondriale, du développement au fonctionnement musculaire.....	347

Le gène <i>Hacd1</i> est un régulateur de la composition des membranes mitochondriales et de la morphologie du réseau mitochondrial	349
MitoPLD, une phospholipase mitochondriale qui pourrait expliquer la fragmentation dans le modèle <i>Hacd1</i> -KO	353
<i>Hacd1</i> , d'une thérapie des syndromes métaboliques vers un traitement hormonal ...	355
<i>Dnm2</i> et <i>Cd9</i> , des gènes « médicaments » pour <i>Hacd1</i> ?	357
Le modèle murin <i>Hacd1</i> -KO, un nouveau modèle d'étude de l'importance des AGTLC et de la CL	358
Bibliographie	361

TABLE DES FIGURES

Introduction

Figure 1 : Description clinique chez le Labrador retriever.	28
Figure 2 : Caractéristiques des formes humaines de myopathie consécutives à la déficience en HACD1.....	30
Figure 3 : Orthologie structurale et fonctionnelle chez les eucaryotes des protéines apparentées à HACD1	32
Figure 4 : Expression et fonction d' <i>Hacd1</i>	34
Figure 5 : Structurt rôle des acides gras à très longue chaine (AGTLC).	36
Figure 6 : Description du modèle de souris <i>Hacd1</i> -KO.....	38
Figure 7 : Développement séquentiel de la fibre musculaire syncytiale.....	40
Figure 8 : Rôle d'HACD1 dans la fusion des myoblastes.	44
Figure 9 : Import de substrats énergétiques vers la mitochondrie et production aérobie d'ATP.	48
Figure 10 : La production d'énergie cellulaire <i>via</i> la mitochondrie.....	50
Figure 11 : Modulation de la biogenèse mitochondriale par l'exercice.	54
Figure 12 : Organisation structurale et ultrastructurale du muscle.	56
Figure 13 : Types de fibres musculaires et leurs caractéristiques.	60
Figure 14 : Bases moléculaires de la biogenèse mitochondriale.....	64
Figure 15 : Structure mitochondriale, au service de la fonction respiratoire.	66
Figure 16 : Production des phospholipides mitochondriaux à l'interface de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique.	70
Figure 17 : Chaîne respiratoire mitochondriale.....	74
Figure 18 : Dynamique du réseau mitochondrial.	82
Figure 19 : Hétérogénéité génétique des myopathies centronucléaires.	94
Figure 20 : Hétérogénéité et classification des myopathies congénitales.	108
Figure 21 : Myopathie mitochondriale et atteinte multi-organes.	110

Résultats

Figure 1 : Quantification des contacts réticulum sarcoplasmique-mitochondrie.....	288
Figure 2 : Morphologie du réseau mitochondrial dans des myofibres.....	292
Figure 3 : Etude de la dynamique mitochondriale et de l'autophagie.....	294
Figure 4 : Evaluation des caractéristiques physiques des membranes mitochondriales.	296
Figure 5 : Morphologie du réseau mitochondrial dans des myoblastes primaires.	297
Figure 6 : Morphologie du réseau mitochondrial dans des myotubes primaires.	298
Figure 7 : Caractérisation de l'ADN mitochondrial chez les souris <i>Hacd1</i> -KO.....	300
Figure 8 : Test de fusion mitochondriale <i>in vitro</i>	302
Figure 9 : Validation de la délétion d' <i>Hacd1</i> par knockout conditionnel à l'âge adulte après recombinaison.	310

Figure 10 : Etude de la délétion d' <i>Hacd1</i> à l'âge adulte chez les individus femelles.....	312
Figure 11 : Etude de la délétion d' <i>Hacd1</i> à l'âge adulte chez les individus mâles – Métabolisme du glucose et masse musculaire.....	313
Figure 12 : Etude de la délétion d' <i>Hacd1</i> à l'âge adulte chez les individus mâles – Métabolisme énergétique lors d'un régime riche en graisse	314
Figure 13 : Etude de la délétion d' <i>Hacd1</i> à l'âge adulte chez les individus mâles – Fonction mitochondriale.....	316
Figure 14 : Vérification de l'inactivation d' <i>Hacd1</i> à trois semaines et à trois mois après injection d'un AAV-shRNA.....	318
Figure 15 : Effet de l'inactivation d' <i>Hacd1</i> par un AAV-shRNA sur les masses corporelle et musculaire.	320
Figure 16 : Effet de l'inactivation d' <i>Hacd1</i> par un AAV-shRNA sur la respiration mitochondriale.....	322
Figure 17 : Expression de la protéine DNM2 chez les individus WT et <i>Hacd1</i> -KO.....	328
Figure 18 : Effets de la diminution de l'expression de <i>Dnm2</i> chez les femelles <i>Hacd1</i> -KO.	330
Figure 19 : Effets de la diminution de l'expression de <i>Dnm2</i> chez les mâles <i>Hacd1</i> -KO – Métabolisme du glucose et masse musculaire.....	331
Figure 20 : Effets de la diminution de l'expression de <i>Dnm2</i> chez les mâles <i>Hacd1</i> -KO – Fonction musculaire.	332
Figure 21 : Effets de la diminution de l'expression de <i>Dnm2</i> chez les mâles <i>Hacd1</i> -KO – Fonction mitochondriale.	334
Figure 22 : Effets de la diminution de l'expression de <i>Dnm2</i> chez les mâles <i>Hacd1</i> -KO – Métabolisme énergétique lors d'un régime riche en graisse.....	335
Figure 23 : Morphologie du réseau mitochondrial chez les souris <i>Hacd1</i> -KO hétérozygotes pour <i>Dnm2</i>	336
Figure 24 : Test du sauvetage de la myopathie due à la délétion d' <i>Hacd1</i> par délétion de <i>Cd9</i> chez les femelles.....	342
Figure 25 : Test du sauvetage de la myopathie due à la délétion d' <i>Hacd1</i> par délétion de <i>Cd9</i> chez les individus mâles.....	344
Figure 26 : Hypothèse d'une implication directe de la cardiolipine dans la fragmentation mitochondriale chez les souris <i>Hacd1</i> -KO.....	354

INTRODUCTION

1. *HACD1*, UN GENE DU DEVELOPPEMENT POSTNATAL ET DE L'HOMÉOSTASIE DU MUSCLE SQUELETTIQUE

1.1. LA PERTE DE FONCTION DU GENE *HACD1* CHEZ LE CHIEN ET L'HUMAIN INDUIT UNE MYOPATHIE CONGENITALE

1.1.1. LES MYOPATHIES CONGENITALES SONT DES MALADIES RARES AFFECTANT LES MUSCLES SQUELETTIQUES

Les maladies neuromusculaires forment un groupe hétérogène de maladies affectant les différents éléments du muscle squelettique, du nerf périphérique à l'effecteur musculaire. On y trouve en particulier des maladies provoquant une dégénérescence musculaire, appelées myopathies. Les myopathies congénitales sont des maladies qui affectent les individus très précocement, par définition stricte dès la naissance et de façon étendue selon un consensus, dans les premières années de vie. Ces maladies, très souvent handicapantes voire mortelles, sont dans de nombreux cas intraitables. Elles appartiennent au groupe des maladies rares et posent aujourd'hui de multiples défis biomédicaux (Cowling and Thielemans, 2020; Pelin and Wallgren-Pettersson, 2019).

Identifiées pour la première fois en 1966 (Spiro et al., 1966), les myopathies centronucléaires (*CentroNuclear Myopathy*, CNM) sont un des sous-groupes de myopathies congénitales. Elles sont caractérisées par une hypotrophie et une faiblesse musculaire, une prédominance de fibre de type 1 et une position anormale des noyaux dans les fibres. En effet, une étude histologique des muscles de ces patients montre une centralisation des noyaux des fibres musculaires, ainsi qu'un remodelage des activités oxydatives, avec une désorganisation structurale de plusieurs organites (Romero and Bitoun, 2011). Depuis quelques années, on décrit dans de nombreux cas de CNMs des altérations de la forme, de la répartition et de la dynamique mitochondriale (Cowling and Thielemans, 2020; Hnia et al., 2011; Ravenscroft et al., 2015; Rinnenthal et al., 2018; Tinelli et al., 2013).

1.1.2. IDENTIFICATION PAR ANALYSE DE LIAISON CHEZ LE CHIEN D'UN ALLELE PERTE DE FONCTION D'*HACD1* RESPONSABLE D'UNE MYOPATHIE CONGENITALE

Il y a plus de quarante ans, une myopathie héréditaire du Labrador (HMLR, *Hereditary myopathy of Labrador retriever*) a été décrite (Kramer et al., 1976). Après la découverte de plusieurs pedigrees à travers le monde, une étude génétique a mis en évidence que cette affection était transmise selon le mode autosomique récessive (Kramer et al., 1981). En France, c'est dans les années 90 qu'un labrador présentant une myopathie congénitale est

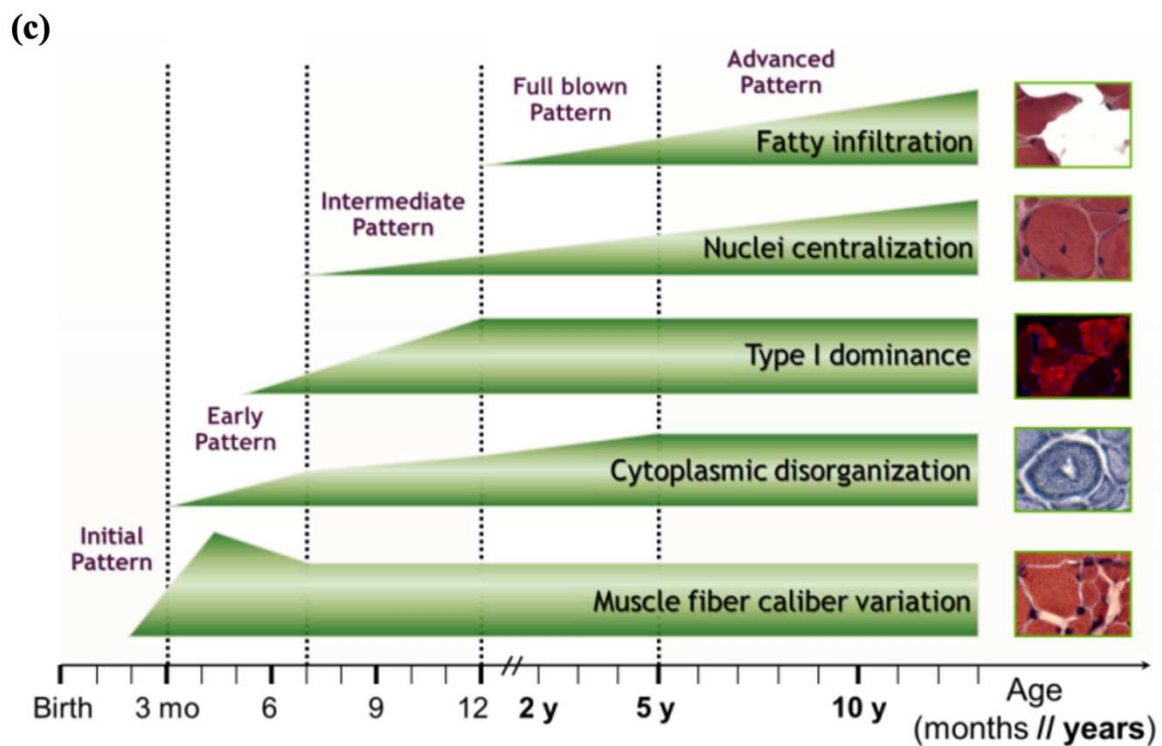
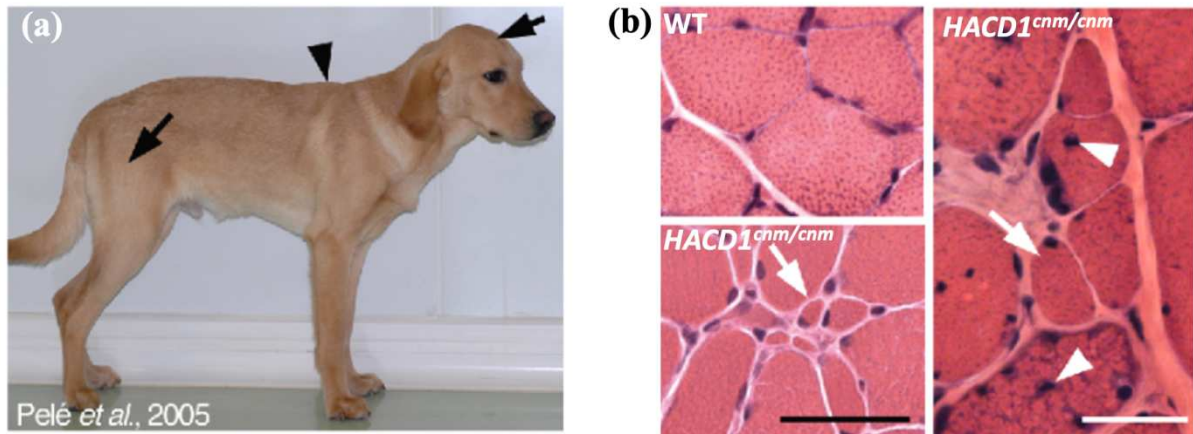


Figure 1 : Description clinique chez le Labrador retriever. (a) Les labradors atteints montrent une perte de masse musculaire avérée par une hypotrophie des muscles temporaux et de la cuisse (flèches), ainsi que ceux de l'épaule avec pour conséquence une scapula saillante (pointe de flèche). **(b)** A l'histologie, les muscles présentent une réduction de la taille moyenne des fibres musculaires (flèches) et une centralisation des noyaux (pointes de flèches) (Barre d'échelle 100 μ m). **(c)** Les cinq séries de modifications histologiques identifiées apparaissent progressivement au cours de la vie de l'animal, définissant cinq grandes étapes dans le remodelage musculaire (Pelé et al., 2005).

présenté au Dr Stéphane Blot, neurologue consultant à l'École nationale vétérinaire d'Alfort (**figure 1-a**). La création d'une colonie de chien et une étude de liaison ont mené au repérage d'une région candidate sur le chromosome 2 du chien (Tiret et al., 2003) puis à l'identification d'un variant du gène *HACD1* systématiquement associé à l'état homozygote avec la maladie (Pelé et al., 2005). Ultérieurement, le lien causal entre ce variant et la myopathie héréditaire du labrador a été renforcé par la détection chez les chiens de nombreux pays atteints de myopathies similaires mais nommées différemment par leurs découvreurs, du même variant du gène *HACD1*, démontrant la dissémination internationale de cet unique variant ayant émergé chez un individu fondateur, probablement au milieu du XX^{ème} siècle (Maurer et al., 2012). Dans le sillage de cette découverte, un test de dépistage a été mis au point au laboratoire afin d'identifier les chiens prédisposés à devenir malades ou mieux, ceux porteurs sains d'un unique allèle muté, évitant ainsi les croisements à risque entre deux parents porteurs.

Le variant résulte de l'insertion d'un *Short Interspersed Nuclear Element* (SINE) dans l'exon 2 du gène *HACD1* (Pelé et al., 2005). Il a été montré que ce variant induit un défaut d'épissage du gène *HACD1*, compatible avec la perte de fonction du gène chez les chiens homozygotes (Pelé et al., 2005).

1.1.3. LA PERTE DE FONCTION D'*HACD1* INDUIT DES SIGNES CLINIQUES SPECIFIQUEMENT MUSCULAIRES

À la naissance, les chiots homozygotes pour le variant sont indistinguables de leurs frères et sœurs de portée. Les premiers signes cliniques apparaissent à l'âge de 4 à 6 mois. Les signes principaux sont une hypotrophie et une faiblesse musculaire engendrant un défaut de posture (ventroflexion, port de tête bas, **figure 1-a**) et une diminution de l'activité locomotrice spontanée (déplacement raide, pas courts) (Tiret et al., 2003). Le phénotype myopathique s'amplifie au cours de la première année, puis se stabilise. À condition d'être suivis et médicalisés pendant des périodes de crise aiguë, les chiens ont une espérance de vie normale et se sont révélés des compagnons de vie très appréciés de leurs propriétaires. Ils ne présentent ni atteinte cardiaque ni trouble neurologique ou cognitif identifié. Le danger pour ces animaux vient surtout d'une insuffisance du tonus musculaire œsophagien, strié chez le chien et atteint chez les chiens CNM. Cette insuffisance peut provoquer des régurgitations avec fausse route dans les voies aériennes supérieures et par conséquent, un risque accru de pneumopathie fatale si elle n'est pas prévenue ou traitée assidûment.

Au niveau histologique, on retrouve de nombreuses anomalies (**figure 1-b**). Précocement, dès deux mois de vie, on observe une hétérogénéité du diamètre des fibres musculaires avec une réduction générale de taille qualifiée d'hypotrophie. Elle devient de plus en plus importante avec l'âge du chien. On note aussi une modification de la localisation des mitochondries, repérées par un marquage de l'activité oxydative. Après ce stade, entre six et huit mois, on observe une centralisation des noyaux, ainsi qu'une dominance de fibres lentes de type I. Cette centralisation, absente chez les chiots, est observée dans 30% des fibres du biceps

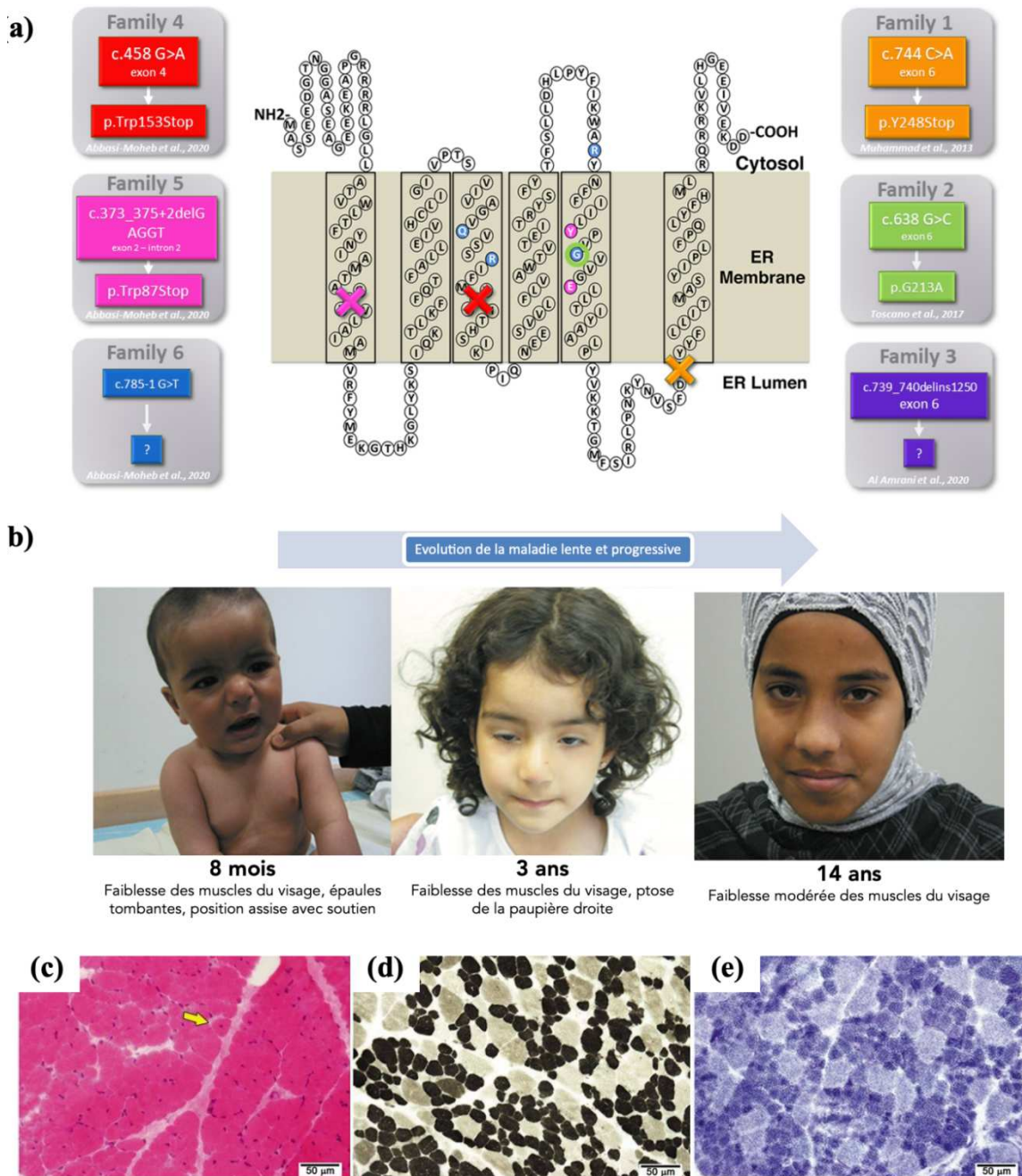


Figure 2 : Caractéristiques des formes humaines de myopathie consécutives à la déficience en *HACDI*. (a) Description des six mutations récessives du gène *HACDI* associées avec une myopathie congénitale (Muhammad et al., 2013; Toscano et al., 2017; Al Amrani et al., 2020; Abbasi-Moheb et al., 2020). (b) Au plan fonctionnel, les patients les plus jeunes sont les plus atteints. (c-e) Coupes transverses du quadriceps d'une patiente biopsiée à l'âge d'un an, montrant un noyau centralisé (flèche jaune) après coloration H&E (c), une disproportion des fibres en faveur de celles oxydatives (type 1, sombres) de petit diamètre (hypotrophie) après coloration ATPase 4.3 (d) et un marquage oxydatif irrégulier anormal dans certaines fibres après marquage NADH (e) (adapté de Muhammad et al., 2013).

fémoral à trois ans, puis dans 60% des fibres à sept ans. La prédominance de fibres de type I, dont le diamètre moyen est réduit en comparaison avec celui des mêmes fibres chez un chien contrôle, est liée à une diminution du nombre de fibres de type II. Tardivement, vers deux ans, on voit apparaître sur les coupes histologiques un épaissement du tissu conjonctif musculaires et une infiltration adipeuse dans le muscle (**figure 1-c**).

1.1.4. PERTE DE FONCTION D'*HACD1* ET MYOPATHIE CONGÉNITALE CHEZ L'HUMAIN

À ce jour, six variants du gène *HACD1* ont été identifiés à l'état homozygote chez les patients à l'intérieur de familles consanguines (**figure 2-a**) (Abbasi-Moheb et al., 2020; Al Amrani et al., 2020; Muhammad et al., 2013; Toscano et al., 2017). Les variants identifiés sont tous compatibles avec une perte de fonction du gène. Dans un cas pour lequel les prélèvements étaient disponibles, l'analyse moléculaire a en effet montré que le variant détecté (c.744C>A) induit une dégradation de plus de deux tiers des transcrits *HACD1* produits et que les 31% restants contiennent un codon stop prématuré (p.Y248Stop) annulant la fonction enzymatique de la protéine *HACD1* (Muhammad et al., 2013). Dans tous les cas analysés sur la durée, les filles et garçons atteints présentaient une myopathie marquée à leur jeune âge, caractérisée par une forte hypotonie, une absence de réflexes au niveau des tendons et une difficulté à se nourrir. Quelques mois plus tard, les épaules sont tombantes, les enfants éprouvent une difficulté à se tenir assis sans aide, accusant un retard de mise en place de la marche. Pour certains, la faiblesse musculaire atteint les muscles du visage. Puis les symptômes évoluent pour progressivement devenir une faiblesse musculaire faciale (**figure 2-b**). Ils ne présentent ni trouble cardiaque ni difficulté respiratoire et ont une cognition normale.

L'évaluation histologique des biopsies, réalisées en majorité avant l'âge de quatre ans, a permis de mettre en évidence une forte variation du diamètre des fibres musculaires avec prédominance de fibres lentes de type I et des marquages de l'activité mitochondriale oxydative anormaux (**figures 2-c, 2-d et 2-e**). La proportion de noyaux centralisés n'était pas anormale. Une biopsie a été réalisée sur une patiente âgée de huit ans et dans ce cas, un nombre légèrement augmenté de noyaux internalisés a été observé (Toscano et al., 2017). Compte tenu de nos observations chez le chien, il est donc probable que les biopsies réalisées chez les patients humains correspondent à un état précoce du processus de remodelage musculaire, compatible avec l'absence à ce stade de noyaux centralisés. En l'absence d'évidence histologique de centralisation nucléaire, les cas de myopathies associées aux variants du gène *HACD1* ont donc été classés dans le groupe des myopathies congénitales à disproportion de taille des fibres (Gonorazky et al., 2018).

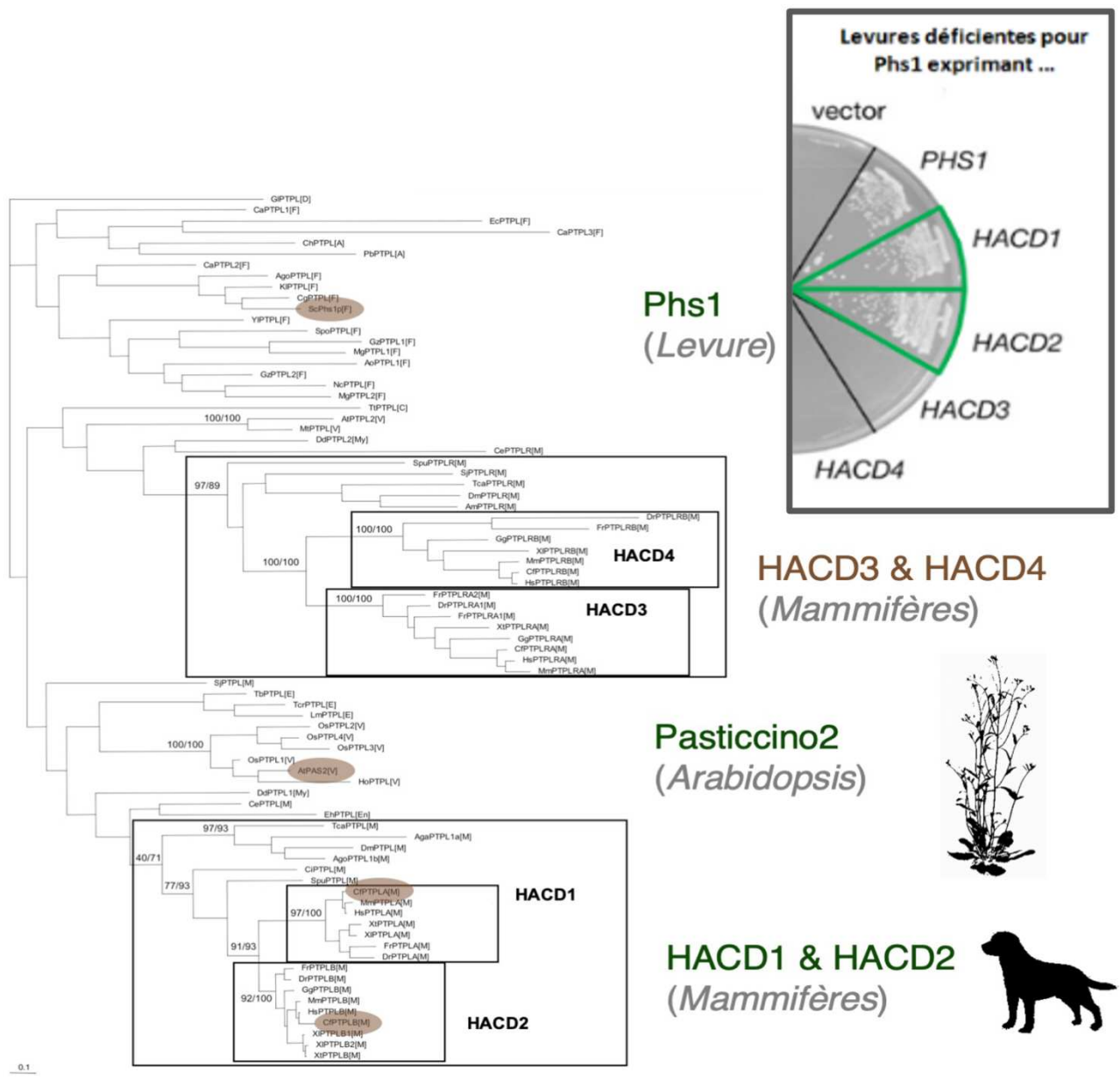


Figure 3 : Orthologie structurale et fonctionnelle chez les eucaryotes des protéines apparentées à HACD1. L'orthologue unique des protéines HACD de mammifères s'appelle Phs1p chez la levure et Pasticcino2 chez les plantes. Chez les mammifères, il existe quatre paralogues numérotées de HACD1 à HACD4. Le couple HACD3 et HACD4 définit un séparé du couple HACD1 et HACD2, proches entre eux et de Pasticcino2. HACD1 et HACD2 ont des séquences moins divergentes de Phs1p (24,1% ou 26,9% d'identité, respectivement) que les deux protéines HACD3 et HACD4 (15,3% ou 19,2%, respectivement) qui forment un groupe distinct. **Encart :** L'inactivation du gène *PHS1* est létale chez la levure. Seuls *HACD1* et *HACD2* sont capables, après réexpression via un plasmide, de sauver la mutation conditionnelle perte de fonction *in vivo* (d'après Ikeda et al., 2008).

1.2. HACD1 EST UNE ENZYME IMPLIQUEE DANS LA SYNTHÈSE DES ACIDES GRAS

1.2.1. L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA PROTÉINE HACD1 EST CONSERVÉE

HACD1 a d'abord été identifié chez les mammifères sous le nom de *PTPLA*, pour *Protein Tyrosine Phosphatase-Like A*. Ce nom lui fut donné en rapport avec la présence dans sa séquence d'un motif spécifique de cette famille (Uwanogho et al., 1999). C'est une étude d'interaction génétique chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* qui a permis l'identification de *PHS1*, l'orthologue de *HACD1*, comme une protéine du réticulum endoplasmique jouant un rôle essentiel dans le métabolisme des sphingolipides (Schuldiner et al., 2005). La perte de *PHS1* par délétion de sa séquence dans le génome de levure est létale. *HACD1* est très conservée à travers les différentes espèces (**figure 3**), suggérant une importance fonctionnelle au-delà de la levure. En effet, l'orthologue chez *Arabidopsis thaliana*, appelé *Pasticcino 2*, demeure capable de restaurer l'activité de *PHS1* chez la levure (Bach et al., 2008).

1.2.2. HACD1 APPARTIENT À UNE FAMILLE DE QUATRE PARALOGUES

Chez les mammifères, trois paralogues d'*HACD1* ont été identifiés : *HACD2*, *HACD3* et *HACD4*. La protéine *HACD2* possède une forte identité et similitude de séquence avec *HACD1*, dans une moindre mesure avec *Phs1p* ; *HACD3* et 4 sont quant à elles plus éloignées (**figure 3**) (Ikeda et al., 2008). Au plan fonctionnel, seuls *HACD1* et *HACD2* sont capables de restaurer la fonction du gène *PHS1* (**figure 3, encart**). Alors qu'*HACD2* et 3 sont exprimés de façon quasi-ubiquitaire (Ikeda et al., 2008; Wang et al., 2004), *HACD1* et 4 sont très spécifiques au niveau tissulaire. *HACD4* est exprimé dans les leucocytes et en faible quantité dans le cœur, le rein, la vessie, le poumon et le placenta (Ikeda et al., 2008). *HACD1* est quant à lui majoritairement exprimé dans le muscle strié, squelettique et cardiaque (**figure 4-a et 4-b**) (Li et al., 2000).

1.2.3. HACD1 EST IMPLIQUÉ DANS LA SYNTHÈSE DES ACIDES GRAS À TRÈS LONGUE CHAÎNE

La protéine *HACD1* possède six domaines transmembranaires et est enchâssée dans la membrane du réticulum endoplasmique (**figure 4-c**) (Erdbrügger and Fröhlich, 2021). Une étude a mis en évidence qu'elle possède une activité 3-hydroxyacyl-CoA déshydratase (Denic and Weissman, 2007), d'où le nom d'*HACD*. Plus spécifiquement, elle participe à la troisième étape d'un cycle d'élongation qui en contient quatre, permettant l'allongement à partir d'acides gras à longue chaîne (AGLC) d'acides gras à très longue chaîne (AGTLC) (**figure 4-c, cadre**). Ainsi, une délétion génétique de *PHS1* provoque une accumulation dans les levures d'AGLC, en parallèle d'une diminution d'AGTLC (Denic and Weissman, 2007).

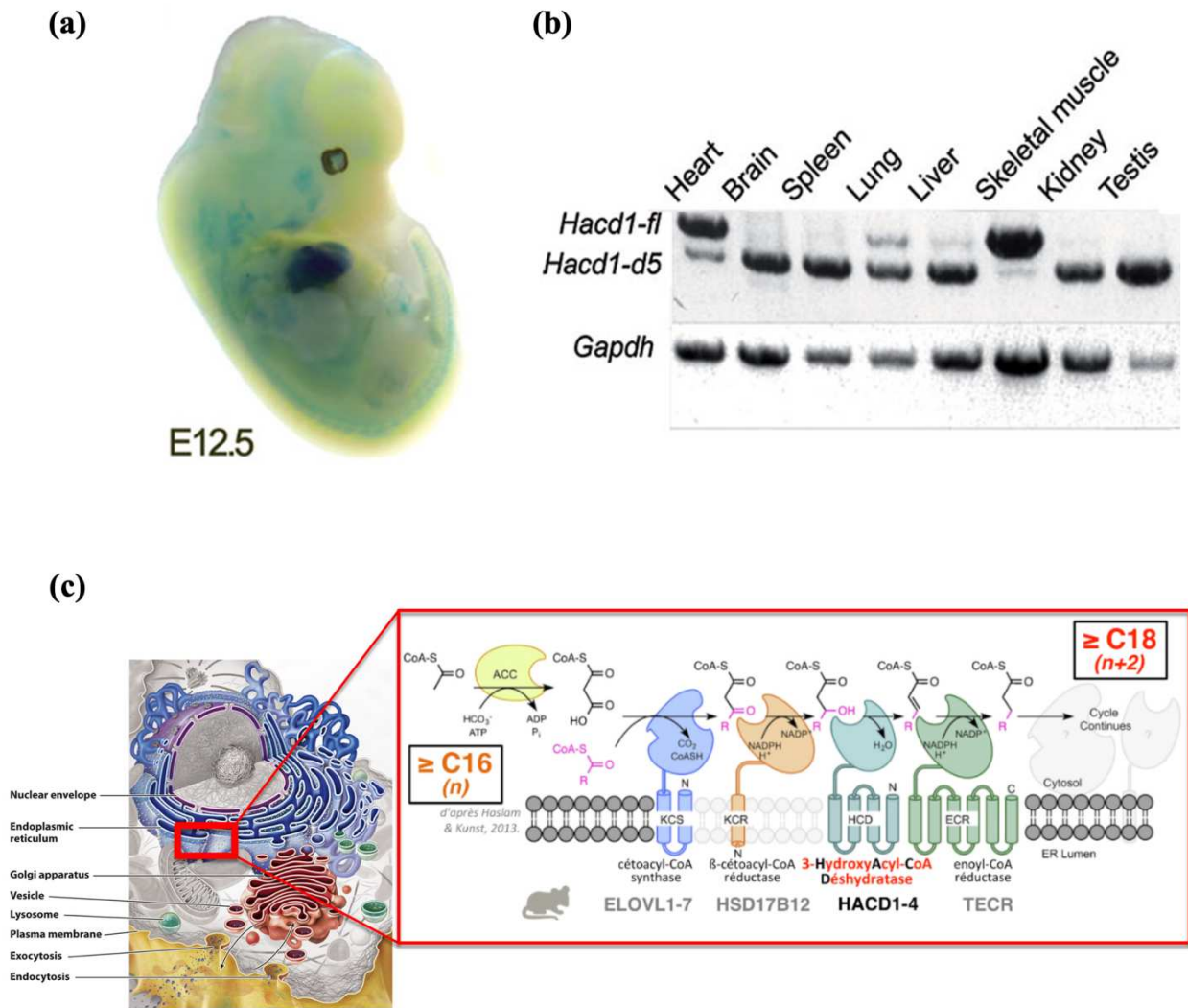


Figure 4 : Expression et fonction d'*Hacd1*. (a) Embryon de souris parvenu à moitié de la gestation. L'expression de la β -galactosidase, sous contrôle du promoteur endogène d'*Hacd1*, est très forte dans le cœur (marquage sombre au centre de l'embryon) et dans les précurseurs des muscles squelettiques, d'origine somitique. (b) Chez la souris adulte, on retrouve une très forte expression du transcrit *Hacd1-fl* dans les muscles striés squelettiques et cardiaque (*adapté de Blondelle et al., 2015*). (c) Le transcrit *Hacd1-fl* code la forme active de la protéine HACD1, protéine à 6 domaines transmembranaires enchâssée dans la membrane du réticulum endoplasmique. Cette enzyme à activité 3-hydroxyacyl-CoA déshydratase catalyse la troisième étape du cycle d'élongation des acides gras à très longue chaîne.

Il est à noter que la définition d'AGTLC que nous donnons ici varie du sens donné par les biochimistes ; il est communément considéré que les AGTLC sont ceux ayant une chaîne carbonée supérieure ou égale à 20 atomes de carbones. Notre définition s'appuie plutôt sur une vision physiologique ; en effet, les AGLC sont allongés dans le cytoplasme par le système de Fatty Acid Synthase (FAS) (Smith, 1994) jusqu'à des chaînes carbonées $\leq C16$, puis sont transloqués au réticulum endoplasmique (RE) pour subir les élongations de chaînes de 18 carbones ou plus (Jakobsson et al., 2006). Notre définition des AGTLC repose donc sur le lieu d'élongation des acides : tout acide gras subissant une élongation dans le cytoplasme (et donc ayant des carbones $\leq C16$ seront considérés comme AGLC et tous ceux ayant une élongation dans le RE seront considérés comme AGTLC (et donc avec $\geq C18$).

L'élongation dans le RE repose sur quatre étapes : tout d'abord une étape de condensation, réalisée chez les mammifères par sept élongases de la famille des *elongation of very long chain fatty acids* (ELOVL). La seconde étape est une étape de réduction par l'enzyme 3-cétoacyl-CoA réductase dont le nom officiel est *Hydroxysteroid 17-Beta Dehydrogenase 12* (HSD17B12). La troisième étape de déshydratation est réalisée par les protéines HACD. Enfin, la dernière étape de réduction est réalisée par 2,3-trans-enoyl-CoA réductase (TECR) (**figure 4-c, cadre**).

De manière physiologique, ces différentes protéines sont essentielles à de multiples fonctions. En effet, ELOVL 1 et 4 sont essentielles à l'imperméabilité et l'intégrité de la barrière épidermique (Aldahmesh et al., 2011), ainsi que dans les fonctions rétiniennes et les photorécepteurs (Agbaga et al., 2010; Harkewicz et al., 2012). ELOVL 2 joue un rôle primordial dans la spermatogenèse (Aversa et al., 1998) et ELOVL3 dans la pilosité et l'étanchéité de la peau (Westerberg et al., 2004). Enfin, ELOVL 5 et 6 participent à la physiologie hépatique (Matsuzaka et al., 2007; Moon et al., 2009). L'ensemble de ces phénotypes et en particulier la létalité précoce des souris déficientes en ELOVL1 et ELOVL4 démontrent la conservation chez les mammifères de l'importance fonctionnelle des AGTLC.

Il existe deux isoformes de transcrits d'*HACD1* dans le muscle squelettique. *HACD1-full-length* (*HACD1-fl*) possède les sept exons du gène et elle est exprimée spécifiquement dans le muscle squelettique et le cœur. *HACD1-deleted in exon 5* (*HACD1-d5*) perd l'exon 5 lors de l'épissage et s'exprime de façon ubiquitaire (**figures 5-b et 5-c**). Il est important de noter que seule la protéine codée par l'isoforme *HACD1-fl* est enzymatiquement active (Blondelle et al., 2015).

1.2.4. ROLES DES ACIDES GRAS A TRES LONGUE CHAINE

Les AGTLC ont une structure classique d'acide gras et peuvent être retrouvés sous forme saturée ou insaturés (**figure 5-a**). Sous forme libre ou intégrés à des lipides complexes, ils définissent ainsi une famille biochimique large qui participe à de nombreux et divers processus tels que la formation de la myéline, la stabilisation des pores nucléaires, le trafic des

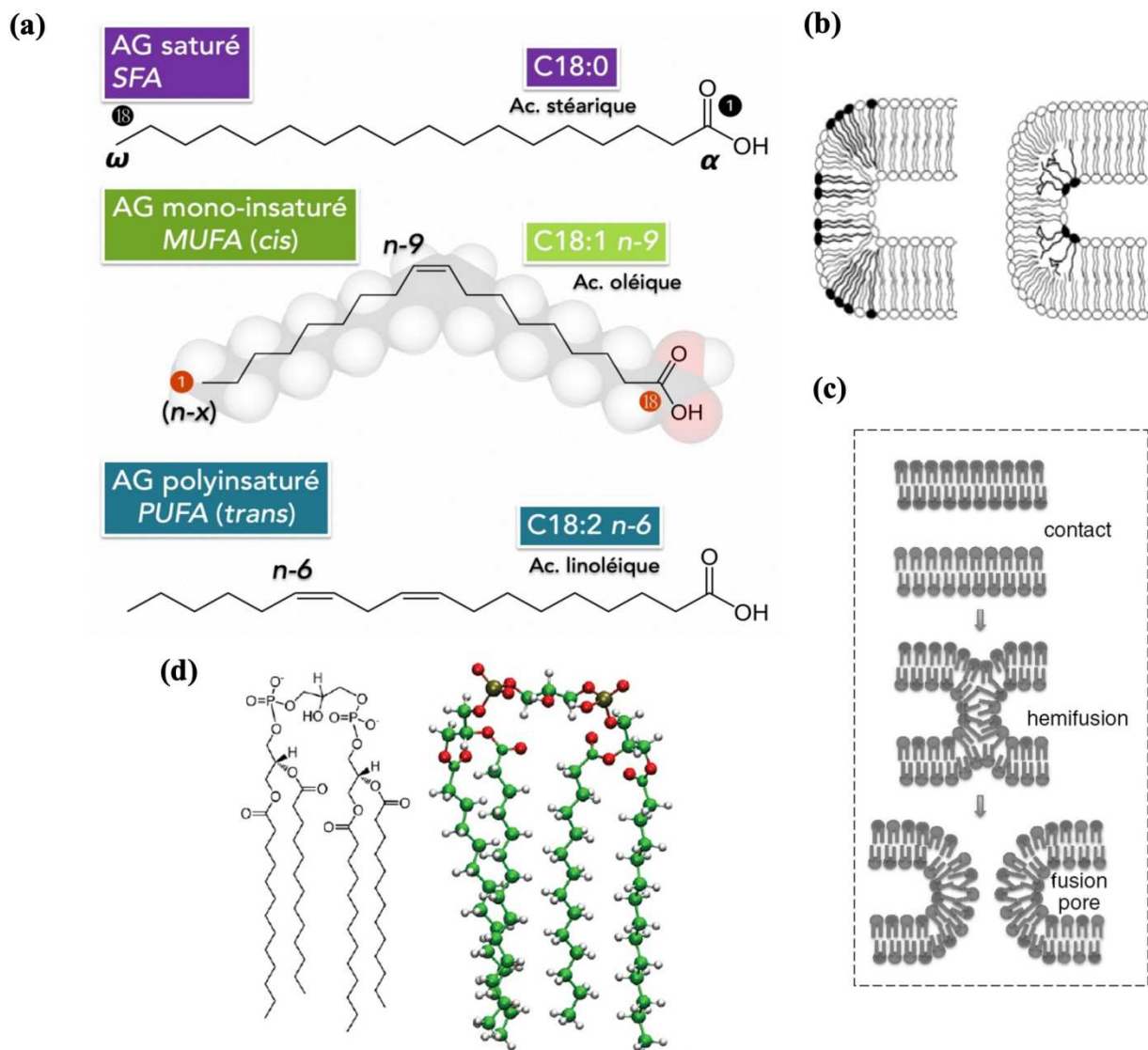


Figure 5 : Structure et rôle des acides gras à très longue chaîne (AGTLC). (a) Un acide gras (AG) est un acide carboxylique à chaîne aliphatique de 12 à 26 atomes de carbones. Les chimistes considèrent le carbone du groupement carboxylique comme le carbone alpha, numéroté 1 (numéros cerclés de noir). Les biologistes considèrent le premier carbone comme celui porteur du groupement méthyle (numéros cerclés d'orange). On appelle AGTLC les acides gras formés d'au moins 18 atomes de carbones. Il existe trois catégories d'AG, les AG saturés (SFA, en violet), mono-insaturés (MUFA, en vert) et polyinsaturés (PUFA, en bleu). Ils sont symbolisés par un "C" suivi du nombre total d'atomes de carbone, puis on précise le nombre d'insaturation(s) ainsi que la position de la première à partir du système de numérotation des biologistes (n-x ; x correspond au numéro du premier carbone impliqué dans l'insaturation). (b) Les AGTLC participeraient notamment à la stabilisation des fortes courbures membranaires en occupant le volume vide de la région hydrophobe à partir du feuillet externe (b, membrane de gauche) ou luminal (b, membrane de droite). (c) Les fortes courbures stabilisées favorisent l'achèvement des étapes de fusion membranaire (*d'après* [Schneiter et al., 2004 \(b\)](#) et [Koslov et Chernomordik, 2015 \(c\)](#)). (d) Structure et composition de la cardiolipine, composée de quatre AGTLC ([Lemmin et al., 2012](#)).

protéines ou encore la régulation de certaines voies de signalisation (Erdbrügger and Fröhlich, 2021). Leur très grande longueur linéaire ou incurvée leur confère des propriétés de stabilisation des fortes courbures membranaires (**figures 5-b et 5-c**) (Schneiter et al., 2004). *Via* la formation avec le cholestérol de microdomaines membranaires appelés radeaux lipidiques, ils participent également à la régulation des voies de signalisation et de transport membranaires (Hannun and Obeid, 2008, 2018). Les radeaux sont plus rigides, ce qui facilite l'ancrage de protéines par une queue glycosylphosphatidylinositol par exemple, ainsi que leur interaction (Briolay et al., 2013; Hannun and Obeid, 2008, 2018). Les sphingolipides sont essentiels pour l'intégrité des membranes, et sont donc primordiaux à une bonne dynamique membranaire (Hannun and Obeid, 2018; Haque et al., 2001).

La cardiolipine (CL, **figure 5-d**) est un glycérophospholipide particulier, enrichi dans la membrane interne de la mitochondrie. La CL possède une tête glycérol reliée à deux phospholipides, eux-mêmes composés de deux AGTLC. La CL a donc quatre AGTLC, ce qui lui confère une structure très particulière de cône inversé. Elle a ainsi la capacité de réaliser de nombreuses interactions protéines-lipides – on considère que la quasi-totalité voire la totalité des CL d'une mitochondrie est associée à des protéines (Schlame et al., 1990)–, ce qui lui confère de nombreux rôles au sein de la cellule. Il existe sans doute une centaine de formes de CL en fonction de la composition en AGTLC.

Au bilan, les différentes affections associées à la déficience génétique des constituants du cycle d'élongation des AGLC en AGTLC (délétion des ELOVL notamment) ont mis en évidence le rôle primordial des AGTLC dans la structure des membranes, à travers plusieurs mécanismes possibles. Ce rôle opère dès le développement embryonnaire et postnatal ou dans certains cas, de façon plus spécifique à l'échelle du fonctionnement d'un organe.

1.3. GENERATION D'UN MODELE MURIN *HACD1*-KO POUR L'ANALYSE DES MECANISMES PATHOGENES ET L'EVALUATION DE METHODES THERAPEUTIQUES

Afin de compléter *in vivo* l'analyse du phénotype résultant de la déficience en *HACD1* et de pouvoir tester en conditions expérimentales les stratégies thérapeutiques qui en découlent, notre laboratoire a généré une lignée murine *Knock-out* (KO), c'est-à-dire déficiente pour la fonction du gène *Hacd1*, appelée lignée *Hacd1*-KO (**figure 6**). La construction génétique ciblée au locus *Hacd1* par recombinaison homologue excise les exons 2, 3 et 4 du gène et nous avons vérifié l'absence de transcrits sauvages *Hacd1* dans les muscles des souris *Hacd1*-KO (Blondelle et al., 2015). Les embryons homozygotes pour l'allèle nul, déficients en *Hacd1*, se développent normalement, ils naissent et deviennent des souris avec une croissance squelettique normale, avérée par une longueur tibiale identique aux animaux de génotype sauvage ou hétérozygotes, considérés comme des animaux contrôles (Blondelle et al., 2015). Néanmoins, nous avons observé que les souris *Hacd1*-KO semblaient moins

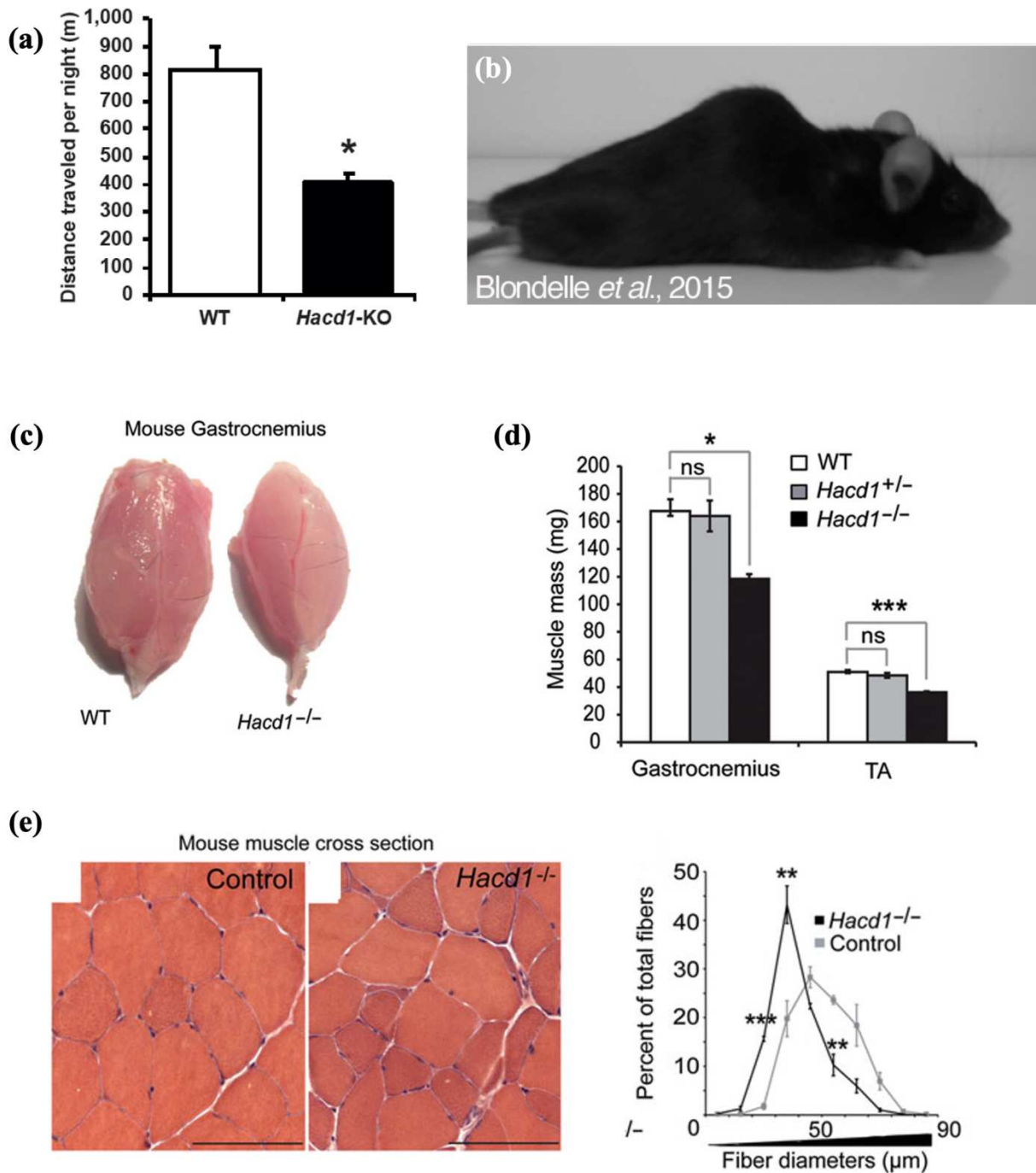


Figure 6 : Description du modèle de souris *Hacd1*-KO. Les souris *Hacd1*-KO (ou *Hacd1*^{-/-}) ont été obtenues au laboratoire. **(a)** L'activité locomotrice spontanée de mâles *Hacd1*-KO âgés de 4-5 mois est divisée par deux en comparaison avec leurs frères de portée. **(b)** Les adultes présentent une cyphose de plus en plus marquée avec l'âge, signe non spécifique d'une atteinte et remodelage des muscles paraspinaux. **(c-e)** Exemple représentatif d'une réduction du volume musculaire (c), associé à une réduction significative de la masse musculaire (d) et un glissement global du diamètre des myofibres vers des valeurs plus petites (Blondelle et al., 2015). Barre d'échelle : 100 μm.

rebondies et par conséquent, les avons soumises à des épreuves fonctionnelles. Nous avons ainsi observé qu'elles présentent une réduction de moitié de l'activité locomotrice spontanée (**figure 6-a**), qu'en vieillissant la plupart était atteinte d'une cyphose de plus en plus prononcée (**figure 6-b**). Nous avons également quantifié un retard de croissance pondérale qui devient significatif dès le dixième jour de vie postnatale et noté un volume réduit des muscles, accompagnée d'une réduction d'environ 30% de leur masse (**figures 6-c et 6-d**). À l'histologie, nous avons observé une hypotrophie des fibres musculaires (**figure 6-e**) (Blondelle et al., 2015). Cependant, la centralisation des noyaux, pourtant très importante chez le chien, n'est constatée dans la ligne murine que de manière épisodique et rare.

Au bilan, les souris *Hacd1*-KO sont viables, ont une croissance squelettique et une fertilité normales mais récapitulent précocement un phénotype de myopathie congénitale avec, en particulier, une disproportion du diamètre des fibres. Ce modèle constitue donc un outil puissant pour évaluer les différents aspects de la maladie et ultérieurement, pour évaluer l'efficacité et l'innocuité d'approches thérapeutiques identifiées grâce à l'analyse en profondeur des mécanismes pathogènes à l'œuvre dans un muscle déficient en *Hacd1*.

1.4. HACD1 CONTRIBUE AU DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE

1.4.1. LE DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE EST SEQUENTIEL

Lors du développement, le muscle est généré par le mésoderme (Buckingham, 1994; Parker et al., 2003) selon un processus appelé myogenèse (figure 7-a). Des cellules souches, appelées cellules satellites, expriment dès lors des facteurs de transcription tels paired-box protein 3 et 7 (PAX3 et PAX7) (Relaix et al., 2006). Ces progéniteurs se différencient ensuite en une lignée myogénique par une activation séquentielle de différents gènes, des Myogenic Regulatory Factors (Mrf), parmi lesquels myogenic factor 5 (Myf5) ou encore myoblast determination protein (Myod) (Kablar et al., 2003; Kassam-Duchossoy et al., 2004). Les cellules satellites ont alors un profil d'expression les entraînant à se différencier en précurseurs myogéniques, les myoblastes, puis en myocytes. Ces derniers ont la capacité de fusionner entre eux, formant des cellules syncytiales appelées myotubes. Les noyaux de ces cellules multinucléées se regroupent alors au centre de la fibre. Enfin, la synthèse de toutes les protéines de l'appareil contractiles provoque le repositionnement de ces noyaux à la périphérie des fibres. La myogenèse jusqu'à cette étape est dite primaire.

La seconde phase de la myogenèse correspond à une augmentation de la masse musculaire par la fusion des myotubes entre eux, ainsi que des cellules souches musculaires, les cellules satellites, avec les myotubes existant (Dunghison et al., 1999) La régénération musculaire repose sur les mêmes mécanismes

La fusion des myoblastes est primordiale à la mise en place optimale du muscle mature et à sa régénération le cas échéant. Cette fusion met en jeu de nombreuses protéines, dont deux

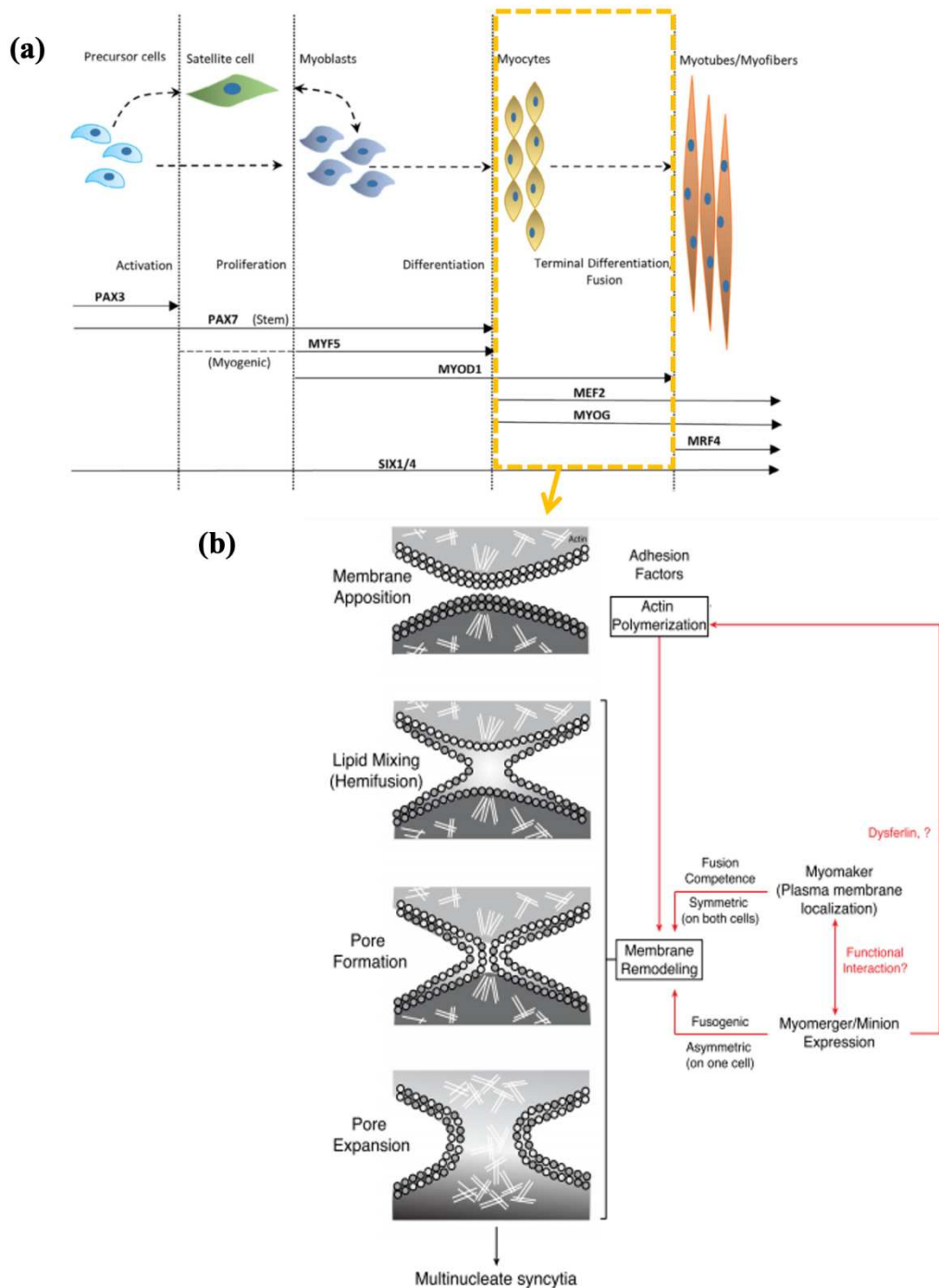


Figure 7 : Développement séquentiel de la fibre musculaire syncytiale. (a) Lors du développement embryonnaire, le déroulement d'un programme myogénique séquentiel impliquant de nombreux facteurs de transcription tels que PAX7, MYOD ou MYOG, permet l'obtention de cellules précurseurs du muscle, les myoblastes, qui se différencieront en cellules allongées, les myocytes. Myocytes et myoblastes fusionnent pour donner un syncytium appelé myotube puis une myofibre (Mukund & Subramaniam, 2019). (b) Lors de la fusion des myoblastes, les cellules s'accolent et leur membrane subit une déstabilisation induite et soutenue par un remodelage de leur composition en lipides qui permet la fusion, le mélange des contenus cytoplasmiques et la formation d'un syncytium (adapté de Sampath et al., 2018).

protéines fusogènes, spécifiques du muscle et très conservées chez les Vertébrés, nommées Myomaker (Millay et al., 2013) et Myomixer (Bi et al., 2017) (aussi appelé Myomerger (Quinn et al., 2017) ou encore Minion (Zhang et al., 2017)). Myomaker a sept domaines transmembranaire et est localisé à la membrane plasmique, ainsi qu'au niveau des vésicules intracellulaires des myocytes, comme les endosomes, le RE et l'appareil de Golgi (Millay et al., 2013). Myomixer est un micropeptide de 84 acides aminés (Quinn et al., 2017) qui joue un rôle d'ancrage de la membrane pour l'adhérence cellule-cellule (Bi et al., 2017) présent sur la membrane plasmique des cellules. Leur expression, spécifique du muscle squelettique, suit la même cinétique d'expression : lors de l'embryogenèse puis plus tard, lors de régénérations musculaires, elle augmente pendant la différenciation et diminue rapidement après la fusion des myoblastes (Bi et al., 2017; Zhang et al., 2017). Elles sont toutes deux régulées par MyoD et MyoG (Chen et al., 2020). Des expériences in vitro suggèrent que Myomaker et Myomixer pourraient interagir de manière transitoire. Myomaker est nécessaire à la surface des deux cellules qui fusionnent, là où Myomerger peut n'être exprimé que par l'une des deux (Millay et al., 2013; Quinn et al., 2017; Zhang et al., 2017). Fonctionnellement, Myomaker est responsable de l'initiation de la fusion et de la formation de l'étape intermédiaire de l'hémifusion, qui en rapprochant les cellules permet la fusion des bicouches membranaires. Myomixer entraîne ensuite la formation et l'expansion du pore membranaire (Chen et al., 2020), qui permet la fusion des cytoplasmes (figure 7-b).

Les étapes clés du développement des myoblastes, incluant leur fusion, ainsi que leur fonction plus tard, sont fortement dépendantes du remodelage de leur membrane plasmique (figure 7-b), au niveau compositionnel et donc au niveau de leur propriétés ; les lipides sont en particulier primordiaux dans ces modifications (Briolay et al., 2013; Leikina et al., 2013; Prives and Shinitzky, 1977).

1.4.2. LE DEVELOPPEMENT MUSCULAIRE REPOSE SUR DES MODIFICATIONS DES MEMBRANES PLASMIQUES

1.4.2.1. LES MEMBRANES SONT DES STRUCTURES PRIMORDIALES DU FONCTIONNEMENT CELLULAIRE

Les membranes sont une délimitation essentielle de la cellule et de ses sous-compartiments. Ainsi, les organites peuvent avoir des caractéristiques propres de pH, ions, enzymes et activités par leur séparation par une ou plusieurs membranes. Les membranes sont par exemple le support de réactions, en permettant l'établissement de gradients moléculaires ou le transport régulé d'ions modificateurs du potentiel de membrane. Ces caractéristiques sont intimement liées à une composition moléculaire qui leur confère des propriétés bien particulières. Malgré ces différences, la structure de base reste la même : une bicouche lipidique d'environ 5 nm d'épaisseur. La composition lipidique ajustable permet de faire varier la valeur de leur fluidité, mais aussi de former une barrière imperméable aux différents molécules hydrosolubles. La composition membranaire dépend aussi des protéines enchâssées

dans la bicouche et qui servent de transporteurs, d'enzymes, ou encore de structure de maintien et d'ancrage.

1.4.2.2. LES MEMBRANES SONT ESSENTIELLEMENT COMPOSEES DE PHOSPHOLIPIDES

Les membranes sont en premier lieu composées de glycérophospholipides, molécules abondantes à tête hydrophile et à queue hydrophobe qui ont, par conséquent, la capacité spontanée de s'organiser en bicouche en milieu aqueux, avec les têtes hydrophiles au contact de l'environnement aqueux et les queues regroupées face-à-face au sein de la bicouche.

Les glycérophospholipides se composent de deux acides gras liés à une molécule de glycérol, elle-même liée à un phosphate ; celui-ci est attaché à un composé polaire hydrophile, par exemple une choline. Les phospholipides majoritaires des membranes sont les phosphatidyléthanolamine (PE), phosphatidylcholine (PC) et phosphatidylserine (PS). La queue hydrocarbonée peut être saturée, c'est-à-dire qu'elle ne possède aucune double liaison entre les carbones et possède donc le maximum possible de groupements hydrogènes. Au contraire, certaines chaînes peuvent être insaturées, ce qui leur confère des structures coudées (**figure 5-a**) qui diminuent leur capacité à former des masses compactées et accroît leur fluidité. Les variations entre les différents acides gras résident donc dans la longueur de leur chaîne et le nombre et position de leurs insaturations. Ces caractéristiques leur offrent différentes propriétés, que ce soit dans la constitution ou dans le métabolisme cellulaire.

Les membranes présentent une répartition hétérogène de ces composants et on trouve même des amas de protéines appelés radeaux lipidiques. Cette hétérogénéité est visible sur la surface de la membrane, mais aussi entre les deux feuilletts : en effet, leur composition permet de s'adapter au mieux à l'environnement à son contact. Cette asymétrie de composition est primordiale puisqu'elle sert à la fois à convertir des messages extracellulaires en signaux intracellulaires et à créer ou entretenir une différence de charges permettant le transport des messagers électriques ou chimiques au sein même de la membrane.

1.4.2.3. LA COMPOSITION MEMBRANAIRE SUBIT UN REMODELAGE LORS DE LA FUSION

Il existe de nombreux types de membranes, aux compositions différentes, ainsi que de nombreux mécanismes de fusion, telle que fusion intercellulaire, exocytose, endocytose, fusion d'organites ou fusion avec des virus. Cependant, un aspect est commun à tous ces phénomènes : les membranes anticipent la fusion en adoptant un remodelage moléculaire permissif (Poste and Allison, 1973). En effet, la fusion demande que les membranes des deux objets se courbent très fortement, parfois même négativement ; on a pour cela besoin de propriétés physiques très particulières, apportées notamment par la composition lipidique. Ainsi, toutes les membranes voient leur fluidité augmenter pour fusionner, gagnant en lipides dits fusogènes, comme le PE – qui permet des courbures membranaires négatives grâce à sa

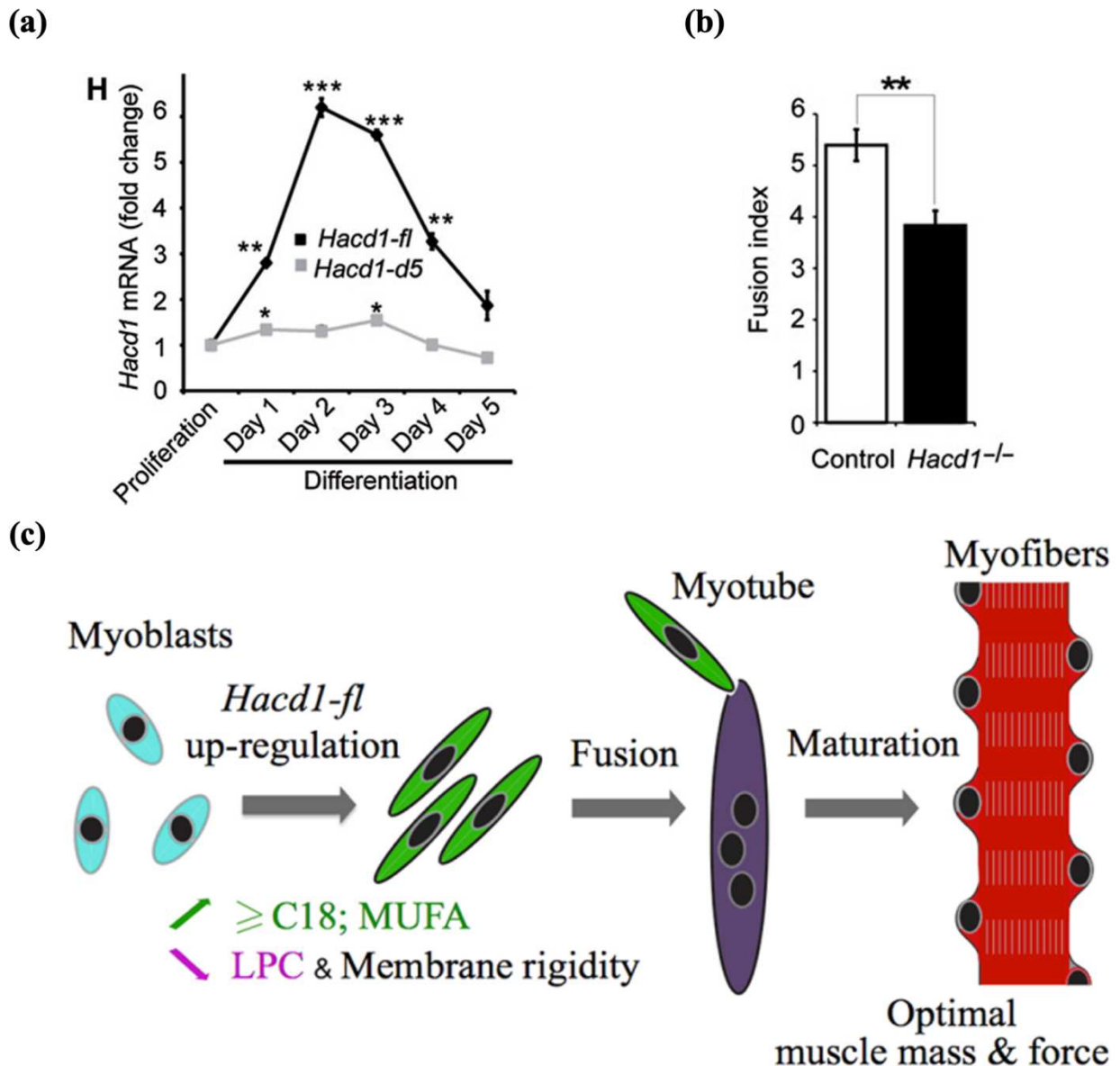


Figure 8 : Rôle d'HACD1 dans la fusion des myoblastes. (a) L'expression du transcrite *Hacd1-fl* codant l'isoforme active d'HACD1 est fortement induite lors de la différenciation des cellules C2C12, une lignée modèle de myoblastes. (b) La déficience génétique en HACD1 induit une diminution significative de l'index de fusion de myoblastes prélevés chez des souriceaux nouveau-nés et mis en culture. (c) Modèle du rôle d'*Hacd1* dans la fusion des myoblastes, recapitulant les modifications de la composition lipidique dépendantes de son expression. Ce remodelage moléculaire conduit à une fluidité accrue de la membrane plasmique des myoblastes et à la diminution du contenu en lysophosphatidylcholine (LPC), un puissant inhibiteur de la fusion. Au bilan, le fusion des myoblastes est promue par l'activité d'HACD1 qui permet le développement de fibres musculaires de diamètre plus important (*adapté de Blondelle et al., 2015*).

forme en cône inversé (Haque et al., 2001), qui stabiliserait les fortes courbures membranaires. En parallèle, il y a une diminution de la quantité de lipides qui rigidifient la membrane, comme le cholestérol ou la lysophosphatidylcholine (LPC), notamment sous forme micellaire (Chernomordik et al., 1985; Günther-Ausborn and Stegmann, 1997). Certains ratios entre différents phospholipides sont primordiaux, comme par exemple le ratio PC/PE (Breckenridge et al., 1973).

Dans le cas particulier de la cellule musculaire, le développement connaît une étape de fusion multiple des myoblastes, permettant la formation d'une longue cellule polynucléée, le myotube primaire. Un changement important de la composition de la membrane plasmique des myoblastes rend leur fusion favorable, par l'accroissement de leur microviscosité (**figure 7-b**) (Prives and Shinitzky, 1977), avec notamment une diminution de la concentration en acides gras saturés et en acides gras à chaîne longue poly-insaturée, provoquant une diminution du ratio saturés/insaturés dans les myotubes par rapport aux myoblastes. On voit donc que dans ce cas, les acides gras poly-insaturés activent la différenciation en modifiant la composition lipidique des membranes plasmiques (Briolay et al., 2013; Leikina et al., 2013).

1.4.2.4. DES PROTEINES FUSOGENES PARTICIPENT A LA FUSION DES MYOBLASTES

La fusion des membranes est aussi permise par de petites protéines transmembranaires appartenant à la famille des tétraspanines. Elles sont très conservées au cours de l'évolution et remplissent des fonctions essentielles (Boucheix and Rubinstein, 2001). Elles participent en effet à de nombreux processus, tels la fusion des membranes, l'adhésion, la motilité cellulaire et des fonctions immunitaires (Fanaei et al., 2011). Certaines ont des activités restreintes dans le temps ou bien limitées à certains organes (Maecker et al., 1997).

Parmi celles-ci, on retrouve CD9 et CD81, qui auraient un rôle de promotion de la fusion des myoblastes lors du développement musculaire (Tachibana and Hemler, 1999; Takeda et al., 2003) et de la régénération musculaire (Charrin et al., 2013). Ils semblent redondants au niveau fonctionnel et leurs effets sont additifs. Une déficience de ces deux gènes conduit à une fusion accrue des myoblastes (Charrin et al., 2013).

1.4.3. HACD1 PARTICIPE AU REMODELAGE DE LA MEMBRANE PLASMIQUE PERMETTANT LA FUSION DES MYOBLASTES

Lors du développement musculaire embryonnaire dans les myoblastes, *HACD1* est surexprimé (**figure 8-a**). Le laboratoire a démontré qu'*HACD1* provoque une augmentation des MUFAs (Mono-unsaturated fatty acids, acides gras saturés) et une diminution de la LPC, ce qui induit une augmentation de la fluidité membranaire (Blondelle et al., 2015). Ceci permet donc aux myoblastes de fusionner entre eux, pour former les syncytia de myofibres.

En l'absence d'*HACD1*, ces modifications de composition n'ont pas lieu et la membrane plasmique des myoblastes est plus rigide. On observe une baisse du nombre de noyaux par fibres (et donc de l'index de fusion, **figure 8-b**), démontrant que la fusion entre eux est moins efficace. Les fibres sont dès lors plus petites, d'où la réduction quantifiée du diamètre des fibres commune aux patients et aux modèles animaux déficients en *HACD1* (**figure 8-c**).

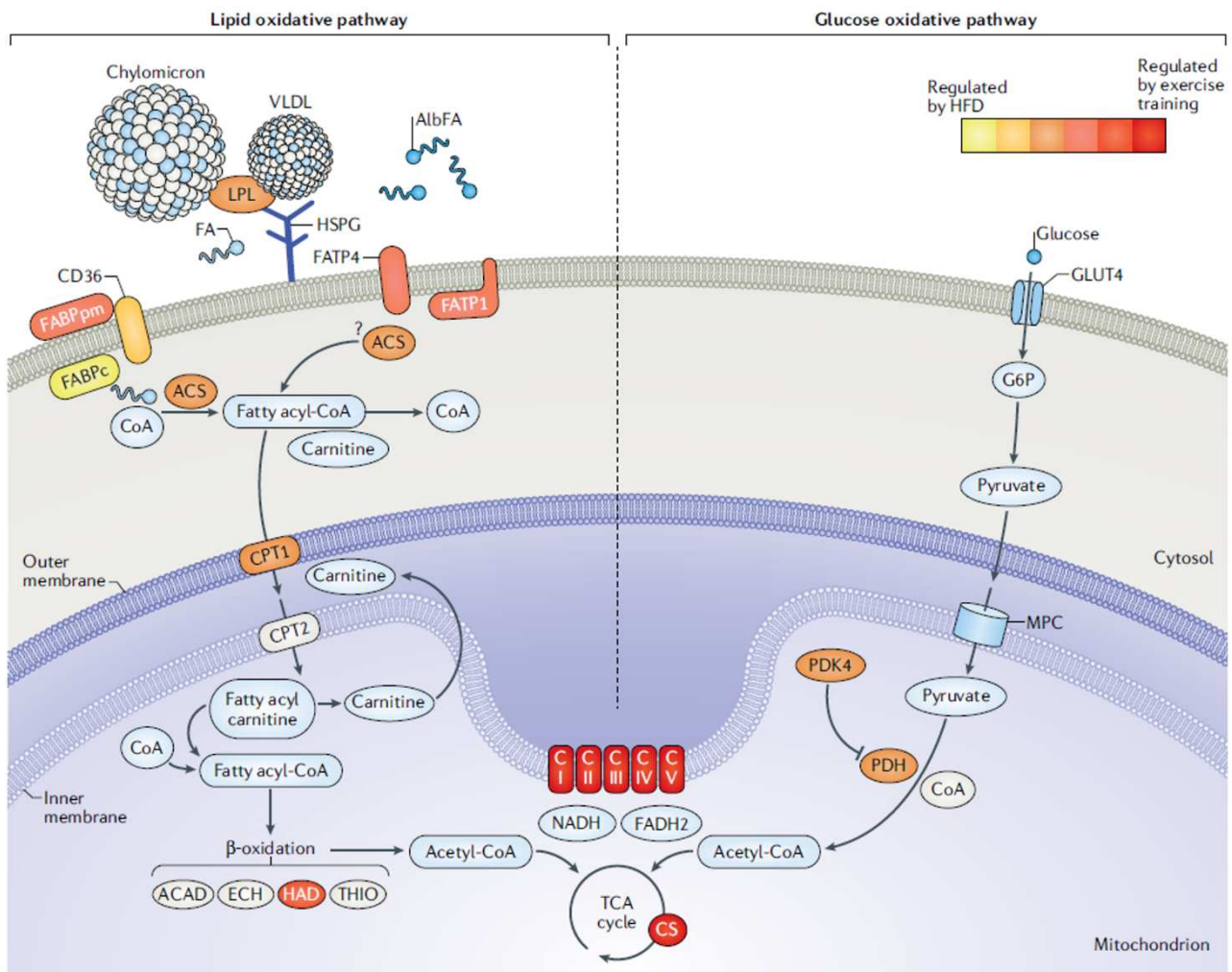


Figure 9 : Import de substrats énergétiques vers la mitochondrie et production aérobie d'ATP. Le glucose et les acides gras sont les substrats énergétiques de la contraction musculaire. Libérés des sources énergétiques majeures, le glycogène et les triglycérides, ils sont produits directement à partir des réserves de la fibre ou importés à partir des réserves extérieures (essentiellement foie et tissu adipeux blanc). Dans les adipocytes, les acides gras sont stockés sous forme de triglycérides, transportés dans le sang via les lipoprotéines de très basse densité (VLDL). Après hydrolyse par la lipoprotéine lipase musculaire (LPL), les acides gras sont importés dans la cellule musculaire, combinés à la coenzyme A (CoA) et à la carnitine qui permet leur transport via les protéines carnitine-palmitoyltransférase 1 et 2 (CPT1/CPT2) jusqu'à la matrice mitochondriale, où ils sont oxydés à des fins de production d'ATP. Le pyruvate issu de la glycolyse est transporté vers la mitochondrie et transformés en acétyl-CoA qui entre dans le cycle tricarboxylique, préambule à la synthèse d'ATP. Certaines étapes clés de ces voies métaboliques productrices d'énergie sont induites par l'exercice (en rouge) ou l'alimentation enrichie en graisse (en jaune) (Fritzen et al., 2020).

2. LE MUSCLE SQUELETTIQUE, UN ORGANE CONSOMMATEUR ET PRODUCTEUR D'ÉNERGIE

2.1. LE MUSCLE SQUELETTIQUE EST UN DES PRINCIPAUX ORGANES CONSOMMATEURS D'ÉNERGIE DE L'ORGANISME

Les muscles squelettiques représentent 40% de la masse corporelle ; ils sont essentiels à la locomotion, la respiration, la nutrition et l'accomplissement des comportements sociaux. De plus, ils sont les principaux acteurs de l'homéostasie énergétique systémique (Baskin et al., 2015). Le muscle est fortement dépendant de sa source d'énergie, l'adénosine triphosphate (ATP). L'intensité de cette demande peut varier de plusieurs ordres de magnitude selon le niveau d'activité (muscle au repos ou en exercice), mais aussi selon le type de fibres musculaires sollicité.

Comme de nombreux processus biologiques, la disponibilité en ATP au sein du muscle dépend donc d'une régulation très fine de son métabolisme, lui-même adapté au besoin énergétique. Pour cela, les mitochondries sont nécessaires à la production massive d'ATP à partir des substrats énergétiques majeurs que sont le glucose et les acides gras.

2.2. LE GLUCOSE ET LES ACIDES GRAS SONT LES COMBURANTS ÉNERGETIQUES DU MUSCLE

Les animaux obtiennent leur énergie en majorité à partir du catabolisme des sucres et des acides gras. Les acides aminés peuvent constituer un apport énergétique complémentaire si besoin, à l'origine d'environ 3% de l'énergie musculaire¹. Les sucres peuvent être stockés sous forme de glycogène (longue molécule de glucose polymérisé) ou, si le stock de glycogène est suffisant, sous forme de graisses, dont l'oxydation produit plus d'ATP que celle du glucose. Toutes ces molécules circulent à travers l'organisme par la circulation sanguine (**figure 9**).

Une fois les acides gras arrivés à l'organe de destination, leur stockage se fait sous forme de triacylglycérols, c'est-à-dire de trois acides gras liés à une molécule de glycérol. Ils constituent une source d'énergie stockée sous forme de gouttelettes lipidiques dans les adipocytes. Les triacylglycérols sont ensuite hydrolysés en glycérol et acides gras. Les gouttelettes sont souvent associées à des organelles dans la cellule, notamment aux mitochondries (Walther and Farese, 2012) qui bénéficient, par cette proximité, des réserves d'énergie libérée *via* la bêta-oxydation qui est une dégradation des acides gras générant les substrats de la chaîne respiratoire (McManaman et al., 2003; Reue, 2011) (**figure 9**).

¹ C'est un pourcentage non négligeable mais faible, raison pour laquelle nous ne développerons pas cette source.

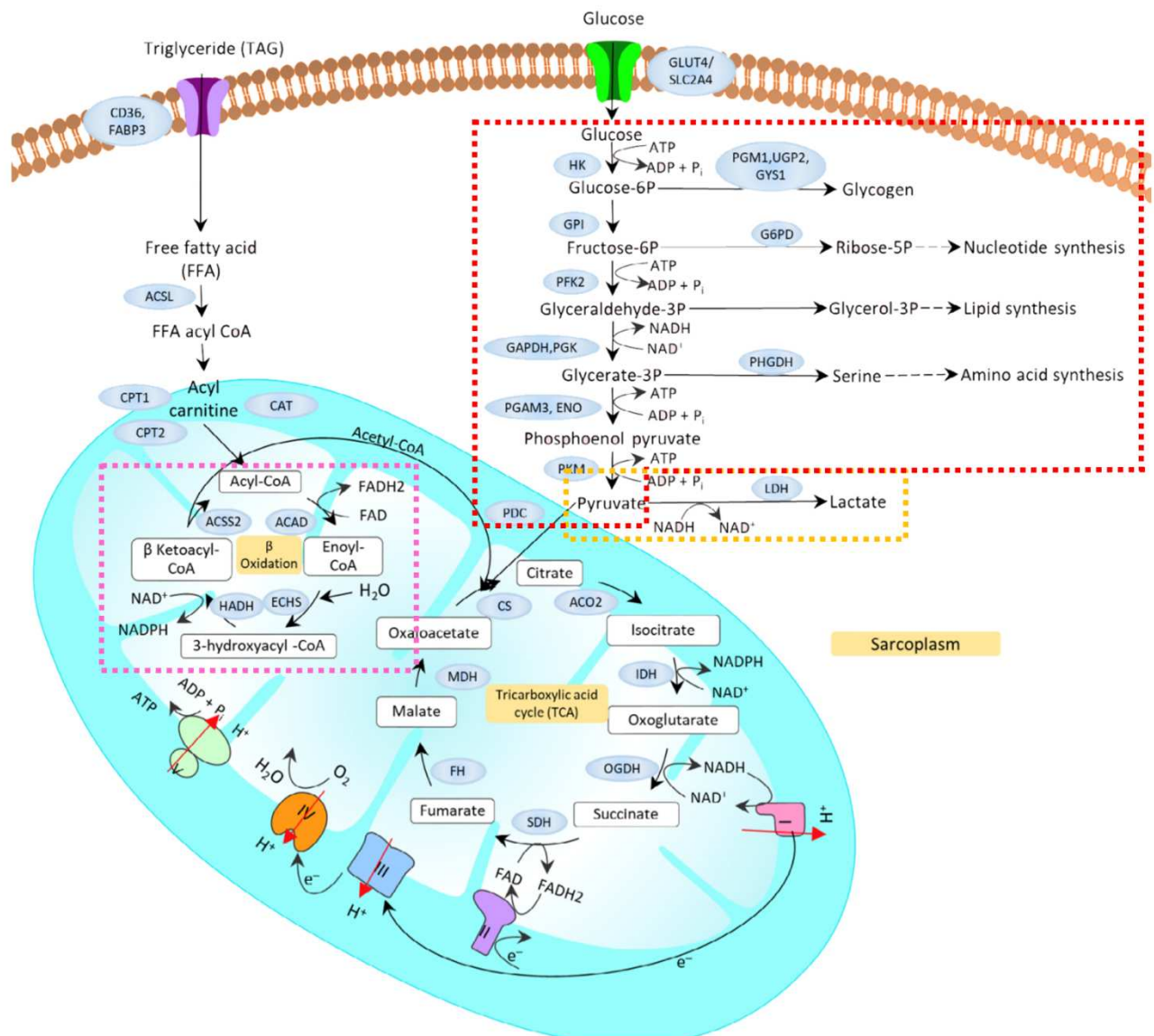


Figure 10 : La production d'énergie cellulaire via la mitochondrie. La glycolyse a lieu dans le cytoplasme et permet la production de pyruvate à partir du glucose (encadré rouge). Le pyruvate peut être utilisé en anaérobie pour produire du lactate et de l'énergie (encadré orange) ou il peut être importé dans la mitochondrie pour être transformé en acétylCoA par le complexe Pyruvate déshydrogénase (PDC). Les acides gras sont importés dans la cellule et convertis en acylCoA à longue chaîne par l'acylCoA synthétase (ACSL). Après importation grâce à la navette CPT1/CPT2 dans la mitochondrie, ils entrent dans des cycles de bêta-oxydation (encadré rose), permettant la production d'un acétylCoA par cycle, en retirant à chaque fois deux carbones à la chaîne des acides gras. Les acétylCoAs produits par la dégradation des sucres et des acides gras entrent dans le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique, TCA) pour être transformés en NADH et FADH₂, substrats énergétiques de la chaîne respiratoire (Mukund & Subramaniam, 2019).

2.2.1. LA GLYCOLYSE PRODUIT DE L'ENERGIE PAR DEGRADATION DU GLUCOSE

2.2.1.1. LA GLYCOLYSE PRODUIT DE L'ENERGIE DANS LE CYTOSOL

Une des façons de produire de l'énergie est l'oxydation des sucres. Cette série de réaction, la glycolyse, se déroule dans le cytosol des cellules. Elle est dépendante de l'ATP mais sans utiliser d'oxygène. On la qualifie donc d'anaérobie.

Au cours de cette série de réactions, une molécule de glucose est convertie en deux molécules de pyruvate, utilisant deux molécules d'ATP dans les premières étapes pour en produire quatre dans les dernières étapes de la réaction. On a donc au bilan deux molécules de pyruvate produites, ainsi que deux d'ATP et deux de NADH (**figure 10, cadre rouge**).

2.2.1.2. LA GLYCOLYSE EST POTENTIALISEE PAR L'IMPORT MITOCHONDRIAL DU PYRUVATE

On le comprend, la glycolyse ne permet la production que d'un nombre limité de molécules énergétiques. Cependant, le pyruvate produit est ensuite rapidement importé dans la mitochondrie où il est décarboxylé par un complexe de trois enzymes formant le complexe pyruvate déshydrogénase (PDC, *pyruvate dehydrogenase complex*), produisant du CO₂, du NADH et de l'acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) (**figure 10**).

2.2.1.3. LA PRODUCTION D'ACIDE LACTIQUE PERMET DE PRODUIRE RAPIDEMENT DE L'ENERGIE DE MANIERE ANAEROBIE

Le muscle squelettique doit cependant pouvoir fournir de l'énergie en présence faible d'oxygène ; ce processus, appelé fermentation, transforme dès lors le pyruvate en lactate (ou acide lactique) *via* la lactate déshydrogénase. La fermentation se déroule dans le cytosol. Ainsi, le NADH produit redevient du NAD⁺, essentiel pour alimenter la glycolyse. Ceci permet de continuer à produire rapidement de l'énergie au cours d'un exercice qui sature les mitochondries. Cette voie est également privilégiée en absence d'oxygène ou si les mitochondries sont dysfonctionnelles. Ce processus anaérobie est limité : à terme, il provoque une augmentation du lactate qui, accumulé, acidifie le muscle et empêche le mouvement musculaire (**figure 10, cadre orange**).

2.2.2. LA BETA-OXYDATION PERMET DE PRODUIRE DE L'ENERGIE A PARTIR D'ACIDES GRAS DANS LA MITOCHONDRIE

Les acides gras offrent un bien meilleur rendement énergétique que le glucose, hydrolysés *via* la bêta-oxydation dans la mitochondrie. Ce processus est cependant plus long et ne peut être utilisé dans le cas d'un besoin rapide en ATP.

Les acides gras entrent dans la cellule musculaire à l'aide de translocases, de transporteurs ou des protéines de surface de la membrane plasmique, tous spécifiques des acides gras (**figure 9**). Une fois entrés dans la cellule, l'acylCoA synthétase leur ajoute un groupe CoA, les transformant en acylCoA à longue chaîne (Berg et al., 2002). La carnitine palmitoyltransferase 1 (CPT1) convertit ensuite les acylCoA à longue chaîne en acylcarnitine à longue chaîne, permettant ainsi une translocation à travers la membrane interne mitochondriale (IMM, *inner mitochondrial membrane*) par la carnitine translocase, qui les échange avec la carnitine. Puis la protéine CPT2, enchâssée dans le feuillet externe de l'IMM, reconvertit ces acylcarnitines à longue chaîne en acylCoA à longue chaîne, qui vont pouvoir entrer dans un cycle de bêta-oxydation. Ils y sont dégradés par un ensemble de réactions qui enlèvent à la molécule deux carbones à chaque cycle, générant une molécule d'acétyl-CoA par cycle. Ceci produit aussi une molécule de NADH et une molécule de FADH₂. L'acétyl-CoA produit sera ensuite dégradé par le cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique, TCA *tricarboxylic acid cycle*) afin de produire des substrats énergétiques (NADH et FADH₂), nécessaires à la respiration mitochondriale (**figure 10, encadré rose**). On a dès lors une forte production d'énergie à partir d'une seule molécule d'acide gras.

2.2.3. LES MITOCHONDRIES SONT LES USINES DE PRODUCTION DE L'ÉNERGIE MUSCULAIRE

On remarque que chez les eucaryotes, les transformations majeures de substrats (glucose sous forme de pyruvate ou acides gras) vers de l'acétyl-CoA se font au cœur de la mitochondrie, qui est le fournisseur primordial de l'énergie de la cellule sous forme de substrats énergétiques telles le NADH et le FADH₂. Ces molécules réduites vont ensuite, au sein même de la mitochondrie, induire une production plus importante d'énergie notamment *via* la respiration cellulaire, fondée sur le transfert de leurs électrons. En fonction de ses besoins, le muscle peut ainsi privilégier l'utilisation du glucose ou des acides gras. Ainsi, le volume mitochondrial d'une cellule saine est le reflet de sa capacité oxydative, puisque les mitochondries consomment 85 à 90% de l'oxygène cellulaire (Gnaiger, 2009) (**figure 10**).

2.3. L'APPORT ÉNERGÉTIQUE S'ADAPTE EN FONCTION DE L'EFFORT GRACE AUX MITOCHONDRIES

2.3.1. LE MUSCLE PEUT ALTERNER ENTRE MÉTABOLISME GLYCOLYTIQUE ET OXYDATIF

La réponse à l'exercice est très dépendante et spécifique du type d'exercice (endurance *vs* résistance), mais aussi de la fréquence, l'intensité et la durée de celui-ci. Suite à un exercice, on observe une modification du muscle et une meilleure résistance à la fatigue (Hood, 2001; Hoppeler, 1986; Pilegaard et al., 2000).

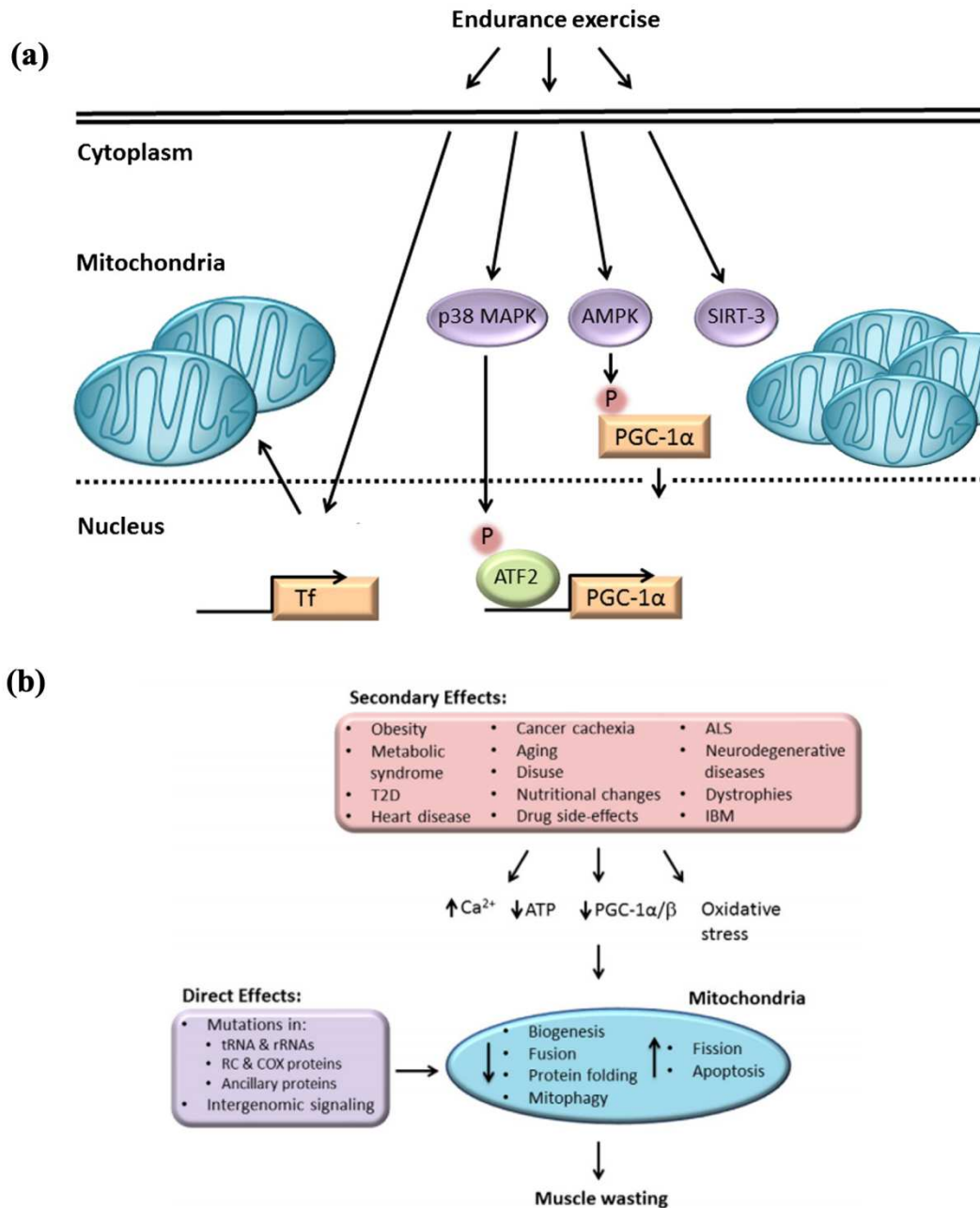


Figure 11 : Modulation de la biogenèse mitochondriale par l'exercice. (a) L'exercice induit l'expression de nombreux facteurs de transcription (Tf) et de protéines modificatrices telles que la p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK), l'AMP-activated protein kinase (AMPK) ou la désacétylase NAD-dépendante sirtuin 3 (SIRT-3), activatrice de l'ATP synthase. Il en résulte une élévation du volume mitochondrial (à gauche), ainsi que l'activation dans le noyau d'un complexe incluant la forme phosphorylée de PGC-1alpha, inducteur de la biogenèse mitochondriale (à droite). Au bilan, la production énergétique est augmentée. (b) Certaines affections conduisent à une utilisation réduite du muscle, on observe alors une diminution des facteurs provoquant la biogenèse mitochondriale et de la production d'ATP, avec pour conséquence une forte diminution de la masse mitochondriale et musculaire (Figures de Russell et al., 2014).

Au cours d'un effort rapide, le muscle a besoin de produire beaucoup d'énergie sur un temps très court. Ceci se fait par l'utilisation du glucose *via* la glycolyse. Mais pendant un exercice prolongé, les muscles squelettiques ont la capacité de passer d'une source énergétique carbonée (glucose) à l'utilisation des acides gras, dont le catabolisme fournit plus d'énergie. Ceci permet de réduire la dépendance du muscle vis-à-vis de la glycolyse, réduisant ainsi la production d'acide lactique et l'utilisation des réserves de glycogène. Cette moindre production de lactate réduit l'acidose et évitera ainsi la fatigue précoce du muscle. Le *switch* d'un métabolisme glycolytique vers un métabolisme oxydatif offre un meilleur rendement énergétique.

2.3.2. UNE DEMANDE ENERGETIQUE FORTE ENTRAINE UNE BIOGENESE ET UNE SYNTHESE DE PROTEINES MITOCHONDRIALES

Le *switch* évoqué repose sur une activité mitochondriale accrue. On observe ainsi de nombreux changements mitochondriaux, dont une augmentation du nombre de crêtes (et donc de la surface de réaction), accompagnée d'une synthèse de protéines de la chaîne respiratoire de transfert des électrons. De plus, la masse mitochondriale est augmentée par une stimulation de la biogenèse mitochondriale. En effet, l'exercice provoque une activation musculaire d'un senseur de nutriment, l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*), activé lors d'une élévation des ratio AMP/ATP ou ADP/ATP. Cette activation provoque une augmentation de l'expression de protéines clés du métabolisme et des enzymes mitochondriales, ainsi que celles impliquées dans la biogenèse mitochondriale (Bergeron et al., 2001; McGee et al., 2003), telles que la PGC1-alpha (*peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) coactivator-1-alpha*) (Cantó and Auwerx, 2009), spécifique du muscle (**figure 11-a**). De plus, on note une augmentation des membres de la famille PPAR (*peroxisome proliferator-activated receptor*) qui activent l'expression des gènes impliqués dans l'import, la liaison et l'oxydation des acides gras (Finck et al., 2005), en parallèle d'une augmentation de la bêta-oxydation. Un autre facteur primordial est l'augmentation des facteurs ERR (*estrogen-related receptor*) qui activent aussi presque tous les aspects du métabolisme mitochondrial, telle la bêta-oxydation, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire (CR) (Giguère, 2008; Perry et al., 2014) ; de plus, il agit sur PPARalpha selon une boucle de rétroaction positive (Huss et al., 2004).

2.3.3. DEFATS OBSERVES DANS LE CAS D'UNE SOUS-UTILISATION MUSCULAIRE

La masse musculaire résulte d'un équilibre entre production et dégradation de protéines (Egerman and Glass, 2014). Ainsi, un usage faible du muscle (microgravité, dénervation, immobilisation, sédentarité, âge) amène à une diminution de la masse musculaire, jusqu'à 0,5 à 0,6% par jour (Wall et al., 2013). De plus, on observe dans ces cas de sous-utilisation une perte de la force musculaire et des capacités contractiles (Hvid et al., 2013), ainsi qu'une atrophie corrélée à une dégradation des ARN (acide ribonucléique) messagers (ARNm)

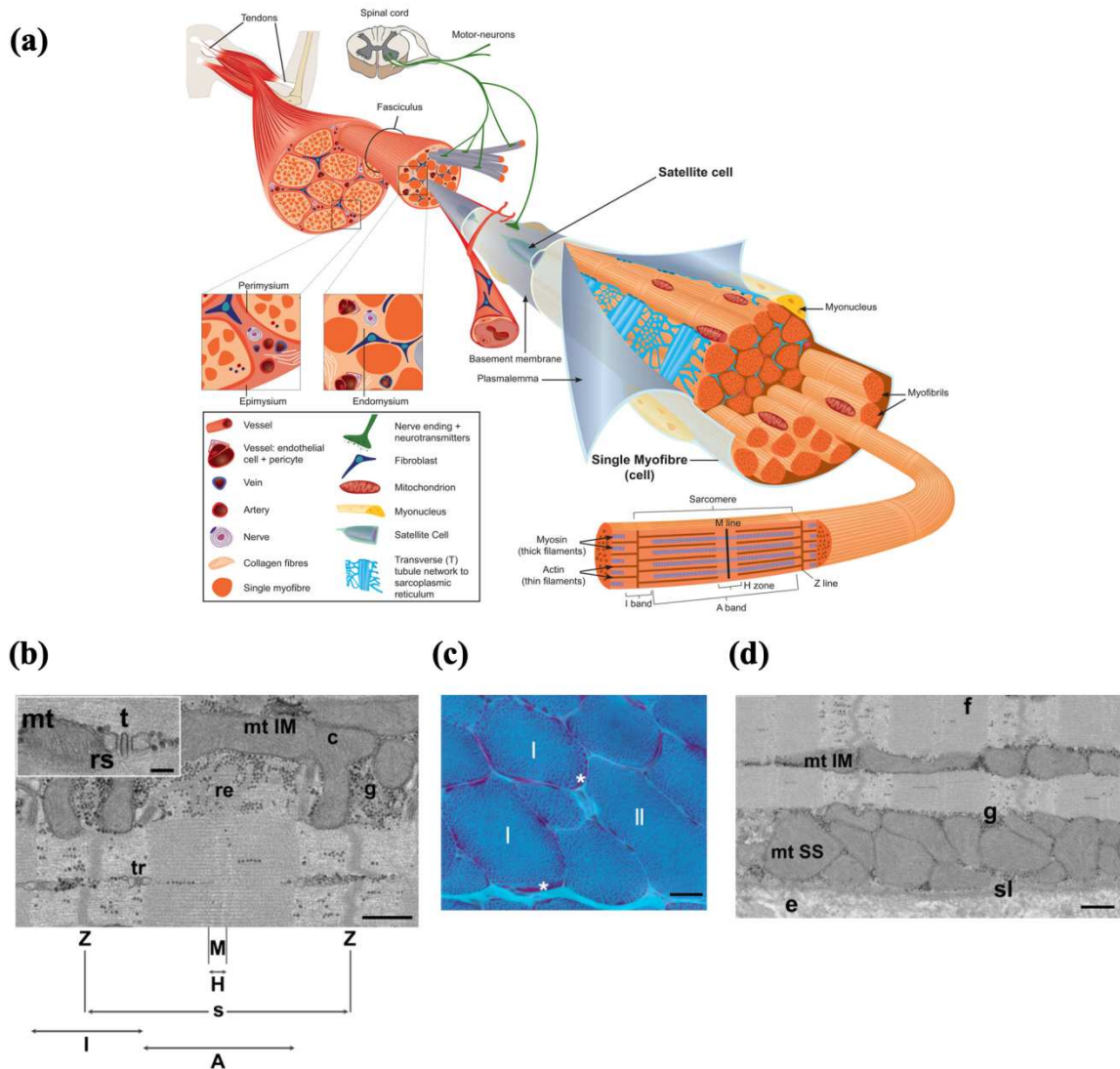


Figure 12 : Organisation structurale et ultrastructurale du muscle. (a) Le muscle squelettique est un ensemble de faisceaux de fibres, eux-mêmes constitués d'un ensemble de myofibrilles, les cellules musculaires. Ces cellules sont elles-mêmes composées de myofibrilles (Tajbakhsh 2009). (b) L'unité contractile de la myofibrille est appelée sarcomère (s), délimité par les lignes Z sur lesquelles s'ancrent les arrangements de filaments fins d'actine, de tropomyosine et de complexes troponine au sein d'une zone isotrope (bande I). Des filaments épais de myosine sont au cœur du sarcomère et combinés aux filaments fins, définissent des bandes anisotropes (bande A). Au centre du sarcomère, on observe la bande M au sein de la zone H. Encart : Le sarcomère est entouré d'un réseau de tubules T (t) et de réticulum sarcoplasmique (rs) définissant une triade (tr) accolée au réseau mitochondrial (mt). (c) En trichrome de Gomori, les mitochondries sont colorées en rouge et en quantité plus importante en particulier en région sous-sarcolemmale (étoiles), définissent les fibres oxydatives de type 1. (d) Il existe deux populations de mitochondries dans le muscle : les mitochondries sous-sarcolemmales (mt SS) et les intermyofibrillaires (mt IM). re : réticulum endoplasmique, c : crêtes, sl : sarcolemme, g : glycogène, f : fibrille, e : endomysium (images personnelles). Barres d'échelle : 500 nm (b) et (d) ; 100 nm insert (b) ; 20 µm (c).

mitochondriaux (Adhihetty et al., 2020; Singh and Hood, 2010; Siu et al., 2005). Ceci affecte donc aussi le contenu mitochondrial et provoque une réduction de la production d'énergie. Ainsi, une semaine d'alitement strict chez un jeune adulte sain provoque une diminution de l'expression des protéines de la CR et de l'activité de la citrate synthétase (Dirks et al., 2016). On observe en parallèle une diminution de PGC1-alpha (Brocca et al., 2012) (**figure 11-b**).

L'ensemble de ce processus participe à l'atrophie musculaire, c'est-à-dire une réduction du diamètre des cellules musculaires, avec pour conséquence une perte de masse et de volume du muscle dus à une diminution de la synthèse protéique. On observe aussi cela dans de nombreux cas de myopathies.

2.4. LE MUSCLE EST ORGANISE DE MANIERE OPTIMALE POUR PRODUIRE DE L'ENERGIE

2.4.1. LE MUSCLE SQUELETTIQUE EST ORGANISE A DIFFERENTS NIVEAUX

Les muscles squelettiques représentent la grande majorité des muscles du corps humain. Ils sont innervés par les motoneurons du système nerveux central, acteurs de la commande motrice sous forme d'un influx nerveux transmis au muscle *via* la jonction neuromusculaire. On parle ainsi de système neuromusculaire. La contraction des muscles squelettiques est très majoritairement volontaire² et peut être maintenue longtemps.

Le muscle squelettique est composé d'un ensemble de fibres musculaires, qui sont elles-mêmes composées de faisceau de myofibrilles, les cellules musculaires contractiles. Enfin, ces cellules contractiles sont formées de faisceaux d'unités contractiles, les myofibrilles (**figure 12-a**).

Le fonctionnement du muscle repose sur sa machine contractile qui lui permet de se contracter puis de se détendre pour produire un mouvement. La contraction est permise par une sous-unité fonctionnelle de la cellule musculaire, le sarcomère, délimité transversalement par les stries Z qui donnent, en microscopie, sa morphologie striée au muscle squelettique (**figure 12-b**). Le muscle se compose de myofilaments, qui permettent de réaliser la contraction par un glissement ATPase-dépendant des fibres les unes sur les autres. Le relâchement musculaire est quant à lui dépendant de l'ATP, il y a donc un fort besoin énergétique lié à l'activité durable du muscle. Au niveau de la jonction neuromusculaire, le bouton terminal de l'axone du motoneurone libère de l'acétylcholine. Libérée dans la fente synaptique, elle se fixe sur un récepteur nicotinique enchâssé dans la membrane postsynaptique musculaire (sarcolemme). La fixation du ligand sur ce récepteur-canal ionique induit son ouverture et crée une entrée d'ions sodium dans le cytosol de la fibre musculaire, créant une dépolarisation membranaire transmise de façon synchrone jusqu'aux myofibrilles

² On peut par exemple noter que le fonctionnement du diaphragme est en grande partie indépendant de la volonté... heureusement !

les plus profondes par une invagination du sarcolemme, appelée tubule transverse ou tubule t. Les tubules t sont répartis le long de la fibre musculaire, en contact étroit avec le réticulum sarcoplasmique (RS), une extension musculaire du RE. L'ensemble composé d'un tubule t et des deux citernes sarcoplasmiques adjacentes s'appelle une triade (**figure 12-b**). Au niveau de chaque triade, la dépolarisation membranaire du tubule t induira la sortie massive d'ions calcium des réserves sarcoplasmiques vers le cytosol, ce qui initiera la contraction. Le passage de l'excitation motoneuronale à la dynamique calcique intracellulaire s'appelle le couplage excitation-contraction et fait entrer en jeu le mégacomplexe protéique associant les canaux calciques lents du tubule t et les récepteurs sarcoplasmiques à la ryanodine de type 1

2.4.2. LES MITOCHONDRIES SE LOCALISENT DANS LES FIBRES MUSCULAIRES POUR REpondRE AUX BESOINS DE LA CELLULE

Dans des cellules musculaires métaboliquement actives, les mitochondries représentent environ 5% du volume de la fibre et sont localisées au niveau des faisceaux des myofilaments (Eisenberg, 2011). Du fait de leur rôle énergétique primordial, les mitochondries sont souvent positionnées dans les zones intracellulaires de haute demande énergétique.

Elles se répartissent dans le muscle en deux catégories : celles concentrées sous la membrane plasmique et proches des noyaux, appelées subsarcolemmales et celles qui se trouvent entre les myofibrilles, appelées intermyofibrillaires (**figures 12-b, 12-c et 12-d**). Les premières sont grandes et allongées et servent probablement à l'apport d'ATP pour les fonctions membranaires ou nucléaires. Les mitochondries intermyofibrillaires sont plus petites, compactes et seraient les fournisseurs d'ATP des myofibrilles, permettant ainsi le cycle contractile. Elles ont aussi des différences de composition et de leurs propriétés, que ce soit au niveau biochimique ou fonctionnel (Takahashi and Hood, 1996). Bien que l'on observe des différences spécifiques, les mitochondries intermyofibrillaires représentent souvent un minimum de 75% du contenu mitochondrial des cellules. Quand le muscle est en défaut d'exercice, leur capacité d'adaptation est différente : les mitochondries intermyofibrillaires, sont capables de plus respirer et leur concentration en ATP est environ deux fois plus élevée que les mitochondries subsarcolemmales (Takahashi and Hood, 1996), dont la qualité réside dans un fonctionnement plus adaptatif.

2.4.3. LES MITOCHONDRIES SE REPARTISSENT EN FONCTION DU TYPE DE FIBRES

Le muscle est constitué de plusieurs types de fibres que l'on peut classer selon une typologie dépendant de leurs différentes propriétés. Les types de fibres ont d'abord été définis en fonction de leur propriété contractile, en catégorie « lente » ou « rapide ». Cette classification est établie sur la présence de différentes isoformes de la myosine contractile : I, IIa, IIb et IIx

(a)

Fiber properties	Type 1	Type 2a	Type 2x/d	Type 2b
Twitch/contraction	Slow	Moderate	Fast	Very fast
Myosin ATPase activity	Slow	Fast	Fast	Fast
MHC isoform	MHC1	MHC2a	MHC2x/d	MHC2b
ATP synthesis	Oxidative	Predominantly oxidative	Glycolytic	Glycolytic
Fatigue	Resistant	Moderately resistant	Fast fatigable	Very fast fatigable
Force production	Weak	Intermediate	Strong	Very high
Endurance capacity	High	Intermediate	Low	Low
Myoglobin content	High	High	Low	Low
Appearance	Red	Red	White	White
Capillaries density	High	High	Low	Low
Mitochondria numbers	High	High	Low	Low
Fiber size (CSA)	Small	Intermediate	Large	Large
Major fuel source	Triglycerides	Creatine phosphate, glycogen	ATP, creatine phosphate, glycogen	ATP, creatine phosphate,
Properties	Use lactic acid	Produce lactic acid, creatine phosphate	Use creatine phosphate	Use creatine phosphate
Motor neuron size	Small	Medium	Large	Very large
Rodents	Present	Present	Present	Present
Humans	Present	Present	Present	Undetectable

(b)

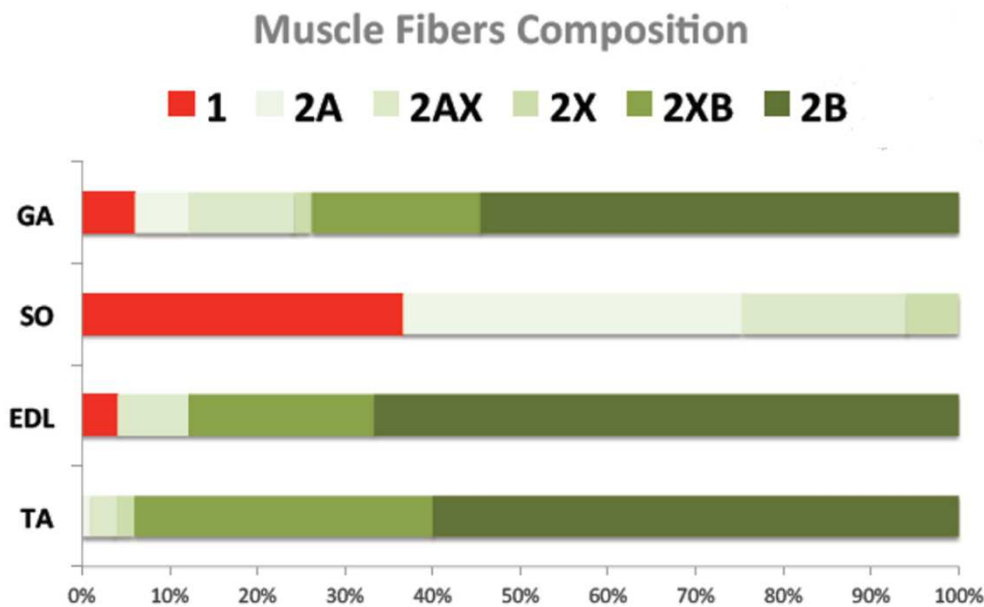


Figure 13 : Types de fibres musculaires et leurs caractéristiques. (a) Les fibres de type 1, 2a, 2x et 2b possèdent des compositions et des caractéristiques différentes (Manickam et Wahli, 2017). **(b)** Les différents muscles squelettiques de souris possèdent des proportions différentes de fibres, leur conférant des aptitudes spécifiques (d'après Augusto et al., 2004). GA : gastrocnémien, SO : soléaire, EDL : *extensor digitorum longus*, TA : *tibialis anterior*.)

(ou 1, 2a, 2b et 2x). Une autre classification, englobant leur caractéristique métabolique, a permis la mise en place de trois catégories (**figure 13-a**).

2.4.3.1. LES FIBRES LENTES OXYDATIVES (FIBRES DE TYPE I)

Elles sont de petit diamètre et expriment la myosine de type I, d'où leur nom. Ces fibres composent principalement les muscles de la posture (par exemple, le soléaire). Le maintien postural demandant beaucoup d'énergie sur une période soutenue. Ces muscles résistants à la fatigue se contractent lentement et ont peu de force. On a alors des fibres qui reposent sur un métabolisme lent mais très productif et qui utilisent les acides gras comme source énergétique. Elles ont pour cela une forte densité mitochondriale et une vascularisation développée, nécessaire à l'apport de substrats, d'où leur coloration rouge intense (**figure 13-a**).

2.4.3.2. LES FIBRES RAPIDES GLYCOLYTIQUES (FIBRES DE TYPE IIB ET IIX)

Elles sont les plus rapides et génèrent le plus de force. Elles sont présentes dans le groupe des grands muscles tels que le gastrocnémien et le quadriceps. De grand diamètre, elles expriment des myosines de type Iib et Iix. Elles sont recrutées dans des activités très intenses mais de courte durée. Ces fibres présentent rapidement des signes de fatigues car, contrairement aux fibres oxydatives, le fait de reposer sur un métabolisme glycolytique aérobie amène à une forte production d'acide lactique, dont l'accumulation provoque une acidose, compromettant le fonctionnement optimal du muscle (**figure figure 13-a**).

Les muscles de l'organisme sont composés en fonction de leur rôle par des proportions différentes de fibres (**figure figure 13-b**). Ainsi, le soléaire, muscle postural très oxydatif, est majoritairement composé de fibres de type I ; le gastrocnémien superficiel, muscle de la course, est glycolytique et composé de fibres de type II en grande partie ; enfin le *tibialis anterior* (TA ou tibial crânial (TC) en français) est un muscle mixte, composé en fonction des zones de diverses combinaisons de type de fibres.

2.4.3.3. LES FIBRES RAPIDES OXYDATIVES (FIBRES DE TYPE IIA)

Chez les mammifères, on les retrouve dans la plupart des types de muscles. Elles expriment la myosine de type Iia. Elles possèdent des caractéristiques intermédiaires, que ce soit en diamètre, en vascularisation et en contenu mitochondrial. Ces fibres produisent très rapidement une grande quantité d'énergie mais sur une période assez courte. Elles reposent à la fois sur un métabolisme oxydatif et glucidique et peuvent orienter le type de catabolisme en fonction de la demande énergétique et de la disponibilité de substrat (**figure 13-a**).

3. LA MITOCHONDRIE, ORGANITE CENTRAL DU METABOLISME ENERGETIQUE

Outre la production énergétique sous forme d'ATP, la mitochondrie joue un rôle central dans de nombreux phénomènes cellulaires tels que la régulation des ROS (*reactive oxygen species*, espèces réactives de l'oxygène), l'homéostasie calcique ou l'apoptose.

3.1. LA STRUCTURE DE LA MITOCHONDRIE, SUPPORT DE SON ACTIVITE

3.1.1. DECOUVERTE DE LA MITOCHONDRIE ET THEORIE ENDOSYMBIOTIQUE

La mitochondrie a été observée pour la première fois en 1857 dans des spermatozoïdes. En 1905, le botaniste russe Konstantin Mereschkowsky propose la théorie endosymbiotique, postulant que la mitochondrie serait une intégration chez les eucaryotes d'un organisme procaryote par endocytose (Mereschkowsky 1905; Martin and Kowallik 1999), survenue il y a 1,5 à 2 milliards d'années. Cette théorie est ensuite étayée par des preuves microbiologiques par Lynn Sagan-Margulis en 1967, ajoutant que cette endosymbiose aurait conféré à la cellule eucaryote un avantage évolutif si conséquent qu'à une exception rapportée (Karnkowska et al., 2016), tous les eucaryotes ayant survécu au processus évolutif possèdent des mitochondries (Sagan, 1967).

3.1.2. LA MITOCHONDRIE POSSEDE SON PROPRE ADN

Les mitochondries sont des organites semi-autonomes. La majorité des 2000 protéines mitochondriales sont en effet encodées dans l'ADN nucléaire mais une partie, décisive, l'est à partir d'un ADN mitochondrial (ADNmt) organisé en 37 gènes (22 transcrits en ARNs de transfert, 2 en ARNs ribosomiaux et 13 codant pour des sous-unités de la CR (Anderson et al., 1981)). La transcription et la traduction des protéines codées par l'ADN nucléaire se font dans le cytosol, à l'aide de facteurs nucléaires. Des translocases permettent l'import mitochondrial des protéines.

Les mitochondries peuvent avoir un nombre important de copies d'ADNmt, généralement en corrélation positive avec le taux de fragmentation des mitochondries (et donc du nombre de divisions qu'elles ont subi). Contrairement à l'ADN nucléaire, l'ADNmt se réplique aussi en dehors de la phase S. De plus, les différentes copies coexistant dans la mitochondrie semblent être choisies au hasard au moment de la réplication, ce qui résulte en un nombre inégal de copies différentes : on appelle « hétéroplasmie » ce phénomène de coexistence de copies distinctes d'ADNmt. L'ADNmt se regroupe en clusters, qualifiés de nucléoïdes – comme pour les bactéries, supposés être attachés à la membrane interne chez les mitochondries. Dans

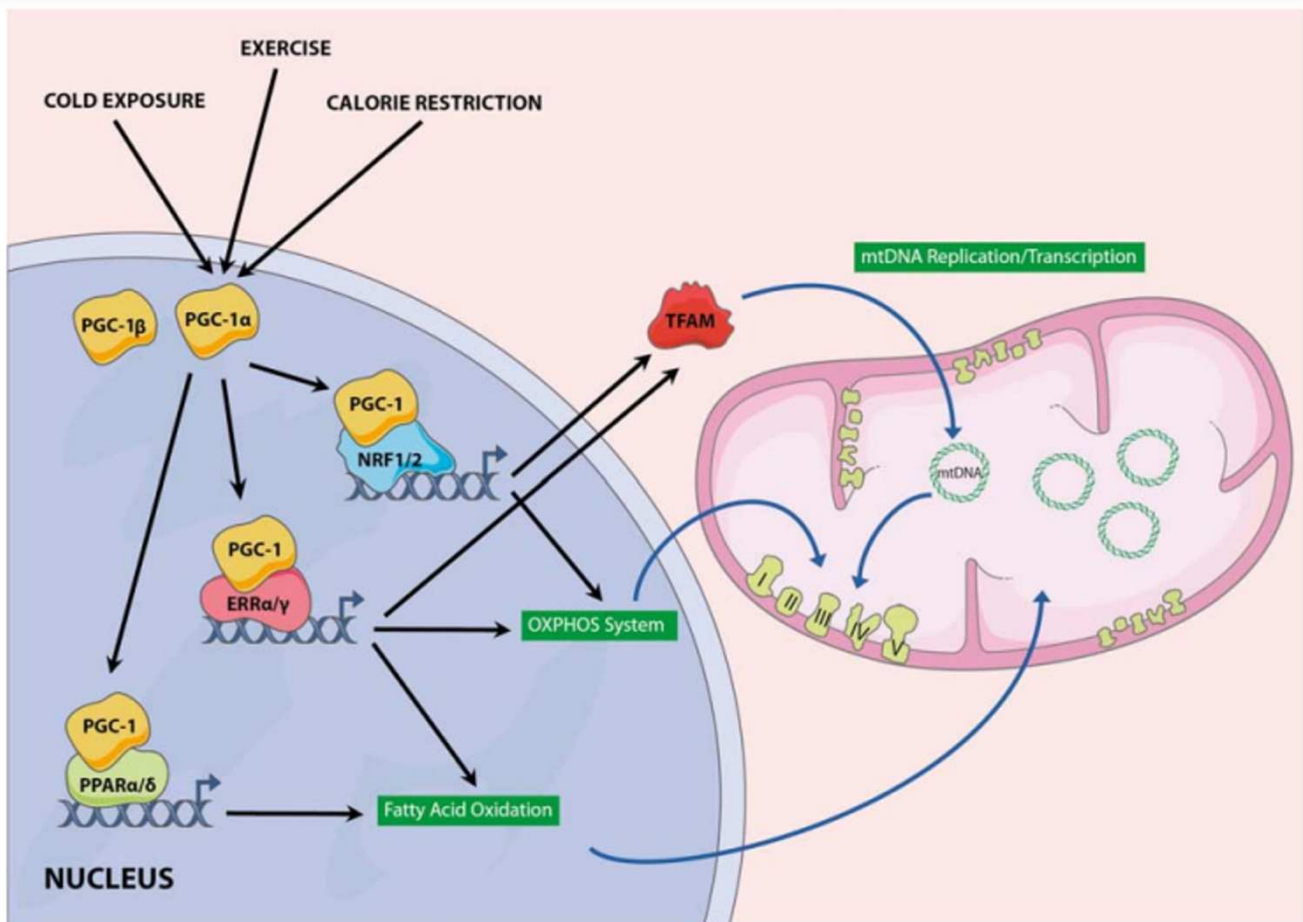


Figure 14 : Bases moléculaires de la biogenèse mitochondriale. Le froid, l'exercice ou la restriction calorique activent l'expression et la translocation au noyau du facteur *peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)-gamma coactivator-1 alpha* (PGC-1alpha) qui agit comme coactivateur de facteurs de transcription tels que les PPAR-alpha et -gamma régulant la bêta-oxydation, les récepteurs apparenté au récepteur alpha aux œstrogènes (ERR-alpha et -gamma) ou les facteurs nucléaires de respiration NRF1 et NRF2, activateurs de la transcription du *mitochondrial transcription factor A* (TFAM), qui induit la réplication de l'ADNmt. Au bilan, PGC-1alpha promeut la biogenèse mitochondriale et la phosphorylation oxydative en leur sein (Zamora and Villena, 2014).

les années 80, on identifie des maladies humaines dites « mitochondriales » dues à des mutations ponctuelles (Wallace et al., 1988) ou à des délétions (Holt et al., 1988) de l'ADNmt, ultérieurement également associées à des mutations dans l'ADN génomique (Lightowlers et al., 2015).

3.1.3. SYNOPSIS MOLECULAIRE DE LA BIOGENESE MITOCHONDRIALE CHEZ LES MAMMIFERES

La masse mitochondriale par cellule est variable en fonction du type cellulaire et peut augmenter pour s'adapter à un besoin croissant. La biogenèse mitochondriale est par exemple activée lors d'un effort physique (Akimoto et al., 2005), d'une restriction calorique (Nisoli et al., 2005) ou d'une exposition au froid (Puigserver et al., 1998; Wu et al., 1999) (**figure 14**). Cette biogenèse est fortement influencée par la fonction mitochondriale et une altération de celle-ci provoque une perturbation de la biogenèse (Garnier et al., 2003; Zoll et al., 2006). Elle se mesure généralement par l'activité enzymatique de la citrate synthase (CS), un marqueur enzymatique quantitatif de la quantité de mitochondries intactes. Elle résulte d'un processus complexe, puisque les protéines nécessaires à cette croissance sont dans le noyau et une minorité dans l'ADNmt. Enfin, les mitochondries ne peuvent pas être produites *de novo* : elles sont le résultat d'une croissance de la masse mitochondriale puis de leur éventuelle division.

La biogenèse mitochondriale est initiée par les protéines de la famille des PGC-1 (*peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) coactivator-1*) et notamment par une surexpression de PGC1-alpha et PGC1-beta, co-activateurs transcriptionnels clés. PGC1-alpha est considéré comme le chef d'orchestre de la régulation de la biogenèse (Adhihetty et al., 2009; Leone et al., 2005), notamment en affectant la configuration des histones, permettant une meilleure accessibilité de la machine de transcription (Handschin and Spiegelman, 2006; Wallberg et al., 2003). Cette surexpression de PGC1-alpha provoque une stimulation de facteurs nucléaires de transcription, notamment de NRF1 (*nuclear respiratory factor 1*), qui active TFAM (*mitochondrial transcription factor A*), provoquant une répllication de l'ADNmt ainsi que la synthèse des ARN messagers (ARNm) de protéines encodées dans le noyau et dans l'ADNmt. Celles-ci sont synthétisées sous formes de pré-protéines dans le cytoplasme, puis sont importées dans la mitochondrie où leur assemblage est finalisé (**figure 14**).

PGC1-alpha permet donc d'orchestrer la biogenèse mitochondriale par la production des protéines nécessaires. Il est exprimé de manière tissu-spécifique et particulièrement dans le cœur ou le muscle squelettique, aux fortes capacités oxydatives. PGC1-alpha est également primordial pour le maintien de l'intégrité et l'homéostasie énergétique des fibres musculaires. Son inactivation dans un modèle murin provoque un changement des fibres de type I et IIa vers IIx et IIb, avec une perte d'endurance et une augmentation des fibres endommagées (Handschin et al., 2007).

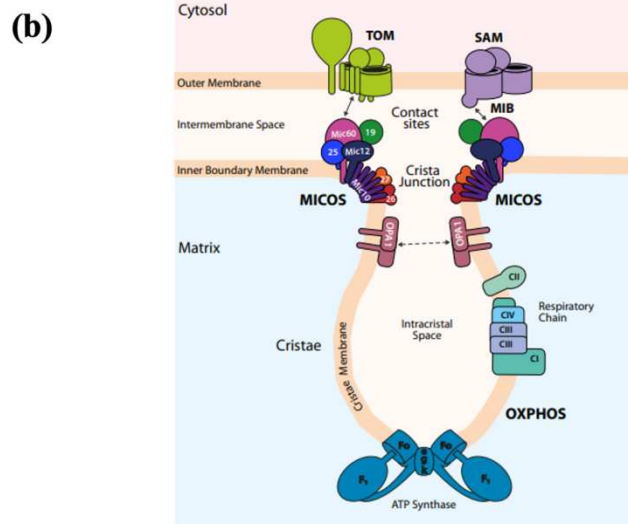
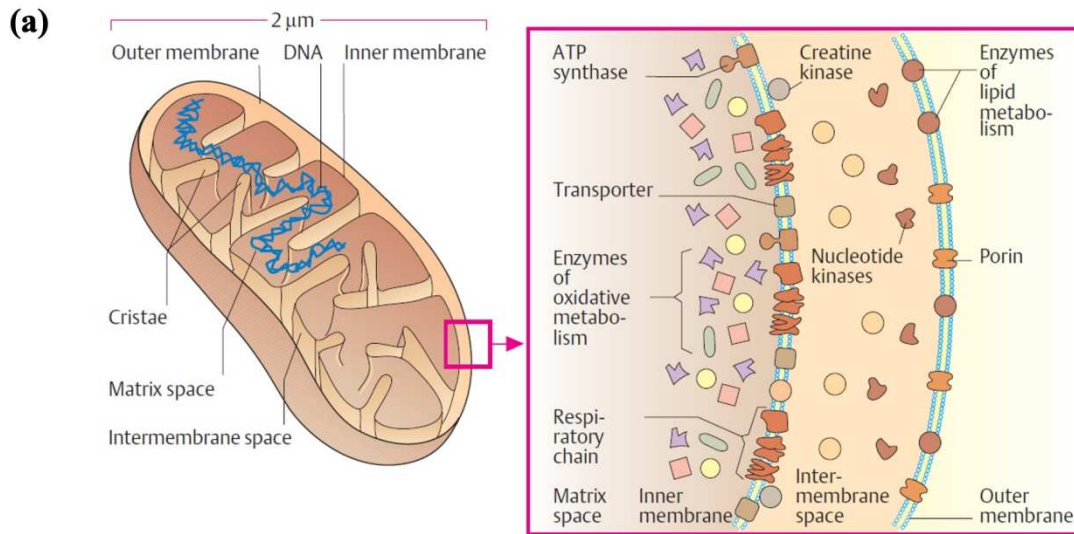


Figure 15 : Structure mitochondriale, au service de la fonction respiratoire. (a) La mitochondrie est un organe délimité par deux membranes, une membrane externe (OMM, *outer mitochondrial membrane*) proche en composition lipidique de la membrane plasmique et une membrane interne (IMM, *inner mitochondrial membrane*) proche en composition lipidique de la membrane bactérienne. A la surface de l'OMM se trouvent des protéines d'import protéique et lipidique. Entre ces membranes se trouve l'espace intermembranaire tandis que l'IMM délimite la matrice. Cette structure permet l'établissement de milieux de composition et de pH différents, créant ainsi des gradients nécessaires au fonctionnement mitochondrial. L'IMM est plissée du côté matriciel, les zones de forte courbure à l'extrémité des plis forment des crêtes. (*figure tirée du site alevelbiology.co.uk*). **(b)** La protéine *dynamain-like* OPA1 permet de maintenir la structure tubulaire des crêtes et participe à leur biogenèse. La base des crêtes est appelée jonction et établit avec l'OMM des sites de contact (CS, *contact sites*). Le complexe MICOS stabilise les CS en induisant une courbure membranaire et en établissant des contacts avec les complexes protéiques de l'OMM. Les dimères de l'ATP synthase F_0F_1 s'alignent spontanément en rangées qui induisent la forte courbure membranaire des crêtes. (*Colina-Tenorio et al., 2020*).

3.2. LA COMPOSITION DES MEMBRANES MITOCHONDRIALES, ELEMENT CLE DE LEURS PROPRIETES

Structurellement, les mitochondries sont constituées d'une double membrane. Elles ont une membrane externe (OMM *outer mitochondrial membrane*), vestige de la structure d'endocytose selon la théorie endosymbiotique et une membrane interne (IMM, *inner mitochondrial membrane*), la membrane du procaryote originel. Le milieu délimité par l'IMM est nommé la matrice mitochondriale, celui entre les deux membranes, l'espace intermembranaire (IMS, *intermembrane space*) (**figure 15-a**).

3.2.1. LA MEMBRANE EXTERNE ET L'ESPACE INTERMEMBRANAIRE

L'OMM forme une surface lisse riche en lipides avec une fluidité membranaire élevée (Horvath and Daum, 2013). Elle est enrichie en phosphoinositides (PI) (de Kroon et al., 1997). On remarque aussi une faible quantité de cardiolipine (CL) (Daum, 1985). Elle joue le rôle dichotomique d'être à la fois une barrière et une plateforme d'échange (**figure 15-a**).

L'OMM contient essentiellement des porines, protéines de transports enchâssées dans la membrane, lui conférant des propriétés de perméabilité aux protéines et constituants de taille inférieure à 5 kDa. Deux des complexes majeurs de ces transports sont le canal anionique voltage-dépendant VDAC (*voltage-dependant anionic channel*) (Colombini et al., 1996) pour les métabolites et TOM (translocase de l'OMM, *translocase of outer membrane*) (Pfanner and Wiedemann, 2002) pour les protéines encodées dans le noyau. La membrane interne leur étant imperméable, elles se retrouvent piégées dans l'IMS. On a donc une différence de milieu entre l'IMS, assez proche du cytoplasme et la matrice, dont les éléments sont sélectionnés.

3.2.2. LA MEMBRANE INTERNE ET LA MATRICE MITOCHONDRIALE

La plupart des réactions se font dans la matrice et l'IMM. Celle-ci, hautement spécialisée, possède une surface en moyenne cinq fois supérieure à l'OMM, bien que ce chiffre puisse être plus élevé lors d'une activité mitochondriale accrue. Elle se replie, formant des invaginations appelées crêtes, au niveau desquelles les éléments de la CR sont enchâssés. Les crêtes constituent donc le support de l'activité des mitochondries : on a une potentialisation de la production énergétique dans la mitochondrie par une augmentation de la surface de réaction³.

Cette capacité à se replier et à former de fortes courbures membranaires, notamment au niveau de l'extrémité de la crête, est due à sa composition membranaire particulière. L'IMM est très enrichie en protéines, avec un ratio lipides/protéines beaucoup plus faible que celui de l'OMM. Mais surtout, sa bicouche est très enrichie en phosphatidyléthanolamine (PE) et CL (Harwood, 1987), essentiels à une production normale d'ATP ainsi qu'à une structure correcte

³ L'augmentation d'une surface fonctionnelle par repliement membranaire existe par ailleurs, par exemple au pôle apical de cellules à microvillosités, ce qui leur confère un pouvoir accru d'échange.

des crêtes. La CL permet de renforcer l'imperméabilité de l'IMM aux ions (Ikon and Ryan, 2017).

En plus de la composition, deux complexes sont primordiaux à l'architecture en crêtes de l'IMM : le complexe MICOS (*mitochondrial contact site and cristae organizing system*) (Friedman et al., 2015) que l'on retrouve au niveau de la frontière de l'IMM et l'ATP synthase qui, sous forme de dimère du complexe F_0F_1 , provoque des courbures membranaires maintenant la structure au bout des crêtes (Habersetzer et al., 2013). Enfin, la protéine OPA1 (*Optical Atrophy 1*) permet le maintien de la crête à sa base (Lee et al., 2017) (**figure 15-b**).

La matrice contient de nombreuses enzymes permettant la synthèse d'acétyl-CoA à partir de pyruvate ou d'acides gras, ainsi que les enzymes du cycle de Krebs. On y trouve également de nombreux transporteurs et canaux pour les métabolites et les protéines à importer dans la matrice, puisque l'IMM y est aussi peu perméable qu'aux protons.

3.2.3. LES SITES DE CONTACT (CS) ENTRE MEMBRANE EXTERNE ET INTERNE

La microscopie électronique a révélé des sites de contacts (CS, *contact sites*) caractérisés par une plus grande proximité de l'OMM et de l'IMM (**figure 15-b**). Ces zones de contact ont été vues comme des sites de translocations de protéines et de phospholipides (Brdiczka, 1991; Pon et al., 1989; Simbeni et al., 1991). On remarque au niveau de ces CS un fort enrichissement en CL (environ 24%), alors que PC et PE sont diminués aux CS chez les mammifères (26% et 22% environ respectivement). Des mesures d'anisotropie des CS de mitochondries de foie murin ont montré une grande fluidité des CS dérivés de l'IMM par rapport à ceux de l'OMM (Ardail et al., 1990). Au niveau de ces CS, on retrouve le complexe MICOS (Bohnert et al., 2012; Harner et al., 2011; Hoppins et al., 2011), permettant l'établissement des CS *via* une connexion des crêtes avec l'OMM. Il a été proposé que ce complexe participe aussi au transfert de protéines (Bohnert et al., 2012).

3.2.4. LA SYNTHÈSE ET L'IMPORT DE LIPIDES MITOCHONDRIAUX

Dans les cellules eucaryotes, la synthèse des acides gras a lieu dans plusieurs compartiments subcellulaires : le cytoplasme, le RE et la mitochondrie.

Dans ces réactions, le RE est essentiel dans la synthèse des phospholipides de la bicouche. En effet, c'est à la surface du feuillet externe du RE, en contact avec le cytosol, que se font les différentes étapes de synthèse des phospholipides et du cholestérol. Ces lipides sont répartis de manière régulière par un processus de « flip-flop » entre le feuillet interne et externe du RE. Le transport de ces lipides vers les organites se fait par l'intermédiaire de vésicules circulantes.

Les phospholipides des mitochondries sont importés du RE ou produits. La mitochondrie possède ainsi des enzymes impliquées dans la biosynthèse et la dégradation des lipides

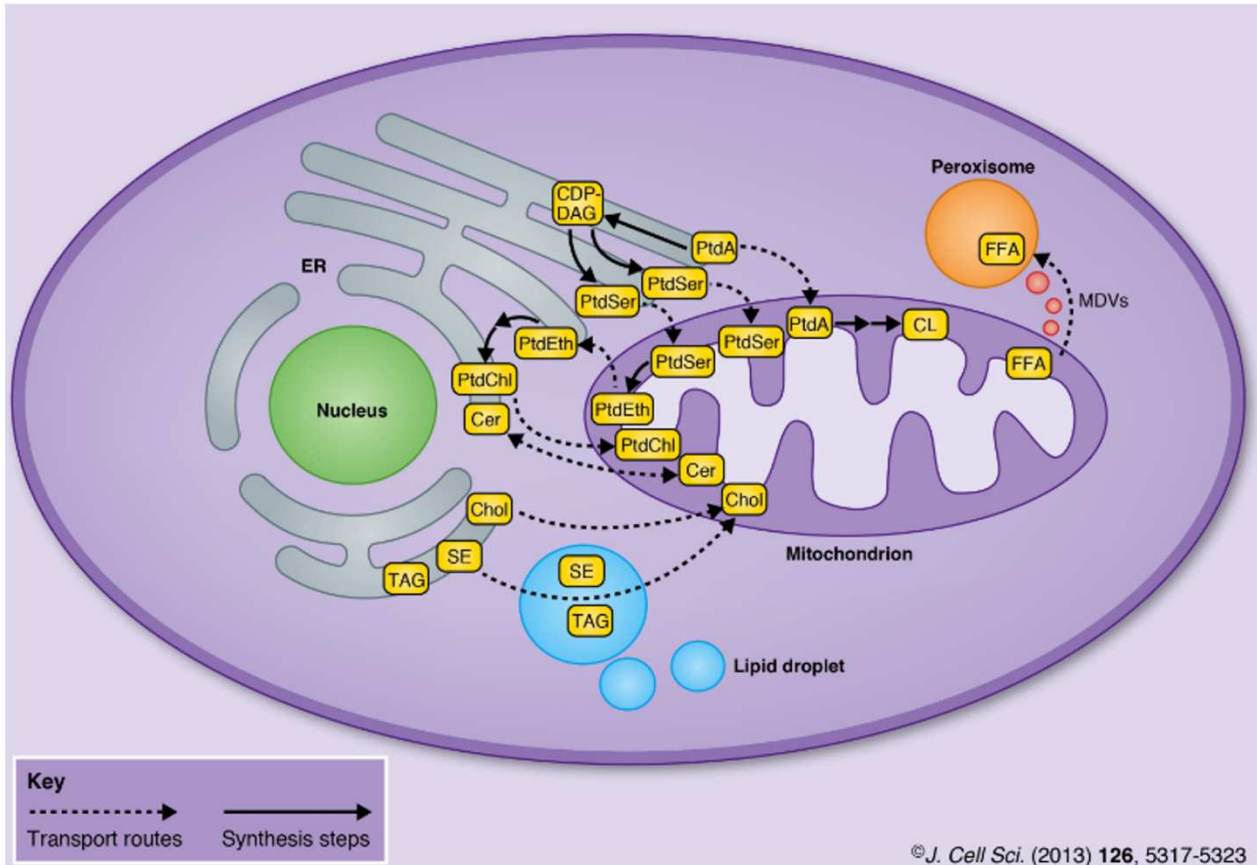


Figure 16 : Production des phospholipides mitochondriaux à l'interface de la mitochondrie et du réticulum endoplasmique. Certains phospholipides mitochondriaux, par exemple de la phosphatidylsérine (PtdSer), sont synthétisés dans le réticulum endoplasmique (ER) puis importés dans la mitochondrie. D'autres, par exemple la cardiolipine (CL) subissent une maturation et une transformation dans la mitochondrie. Ces échanges se font au niveau des contacts entre ER et mitochondrie, les *mitochondria associated membranes* (MAMs) ou *via* un transport par des goutelettes lipidiques (Scharwey, Tatsuta and Langer, 2013).

CDP-DAG : cytidine diphosphate-diacylglycerol, Cer : céramides, Chol : cholestérol, FFA : acides gras libres (*free fatty acids*), PtdA : acide phosphatidique (*phosphatidic acid*), PtdChl : phosphatidylcholine, PtdEth : phosphatidyléthanolamine, SE : stérides (*steryl ester*), TAG : triacylgcérol.

(Flis and Daum, 2013; Gebert et al., 2011; Henry et al., 2012; Kuchler et al., 1986; Serricchio and Bütikofer, 2013; Vance and Vance, 2004). Ces enzymes mitochondriales prennent en charge un large spectre de substrats, contenant des acides gras à courte chaîne (à partir de C2) jusqu'à des substrats intégrant des acides gras de 14 à 16 carbones (Hiltunen et al., 2009). La mitochondrie est donc capable de synthétiser de manière autonome plusieurs lipides, parmi lesquels le phosphatidylglycérol (PG), la CL et en partie le PE (**figure 16**).

Elles peuvent aussi modifier des lipides importés depuis le RE. Pour effectuer ce transfert, les mitochondries et le RE s'accrochent l'un à l'autre et établissent dans ces zones de forte proximité des points de contacts appelés MAM (*Mitochondria Associated Membranes*), qui sont des lieux d'échange et de synthèse collaborative des phospholipides (Csordás et al., 2006; Mannella et al., 1998; Rusiñol et al., 1994; Shiao et al., 1998; Vance, 1990, 1991). Ainsi, certains lipides y subissent des modifications ; par exemple, la mitochondrie transforme le phosphatidylsérine (PS) en phosphatidyléthanolamine (PE) par décarboxylation. Mais la réaction la plus importante est la production de cardiolipine (CL) qui représente près de 20% des lipides de l'IMM et lui confère des caractéristiques essentielles à sa fonction. Les autres lipides, tels PC, PS, PI, les stéroïdes et les sphingolipides doivent être importés. Ceci se fait essentiellement au niveau du RE et des MAMs (Gaigg et al., 1995; Raturi and Simmen, 2013; Rusiñol et al., 1994; Vance, 1990, 1991), indépendamment d'un trafic vésiculaire (Voelker, 2005). On suppose qu'au niveau de ces MAMs, un canal hydrophobe permettrait les translocations des lipides d'un organe à l'autre (Gaigg et al., 1995; Vance, 1990).

Pour répartir les lipides au sein des deux membranes de la mitochondrie, on observe des phénomènes de translocation. Celle du PI, PS et PC semblerait se produire au niveau des CS, indépendamment d'un potentiel électrochimique ou d'un besoin en ATP (Ardail et al., 1990; Lampl et al., 1994).

3.2.5. L'IMPORT DES PROTEINES MITOCHONDRIALES ET MACROCOMPLEXES PROTEOLIPIDIQUES DE LA MEMBRANE INTERNE

Dans les mitochondries de mammifère, le feuillet externe de l'OMM, celui en contact avec le cytoplasme cellulaire, est très enrichi en PE qui représentent jusqu'à 77% du contenu total en lipides de l'OMM (Hovius et al., 1993). Le feuillet interne concentre les PI et PS ; cette accumulation de phospholipides anioniques dans l'OMM suggère des interactions avec des protéines positivement chargées, favorables à leur translocation (Endo et al., 1989; Ou et al., 1988). Parmi les complexes majeurs de translocation des protéines dans la mitochondrie, on retrouve TOM sur l'OMM et TIM (*translocase of inner membrane*) sur l'IMM (Cogliati et al., 2016). L'utilisation de modèles de liposomes a mis en évidence que des précurseurs de protéines mitochondriales peuvent se fixer à des membranes riches en CL, également présentes en faible quantité dans le feuillet externe de l'OMM, ce qui permet de séquestrer les protéines dans une conformation servant à leur translocation. L'affinité des pré-protéines pour

les lipides chargés négativement a été montrée pour être $CL > PG > PI > PS$. La CL de l'OMM semble donc un phospholipide primordial à l'import de protéines mitochondriales.

3.3. LA MITOCHONDRIE EST ESSENTIELLE A LA PRODUCTION D'ENERGIE CELLULAIRE

3.3.1. LA PRODUCTION D'ENERGIE DE LA CELLULE REPOSE SUR DES MOLECULES AUX LIAISONS COVALENTES RICHES EN ENERGIE

Toutes les cellules possèdent des sources d'énergie stockées sous forme de liaisons chimiques de molécules organiques. Chez les animaux, ces molécules énergétiques sont essentiellement apportées par la nourriture et leur énergie est extraite par des réactions chimiques d'oxydation ou de combustion contrôlée.

Ces réactions de dégradation se font à l'aide de nombreuses enzymes. Celles-ci vont récupérer l'énergie contenue dans les molécules en détruisant les liaisons covalentes, via une oxydation (perte d'électrons) ou une réduction (gain d'électrons). Ainsi, la destruction de certaines liaisons permet une libération d'énergie nécessaire à certaines autres réactions de synthèse de molécules qui seraient sans cette énergie thermodynamiquement défavorables. Ces molécules énergétiques sont donc des molécules transporteuses d'énergie.

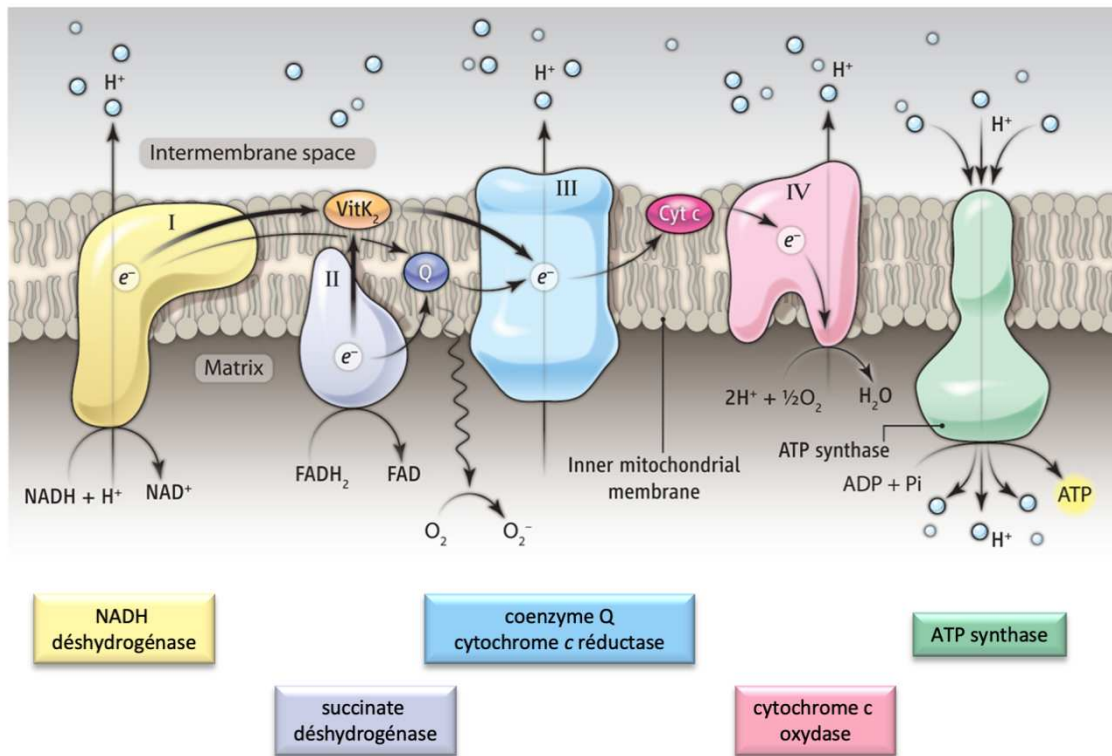
3.3.1.1. L'ADENOSINE TRIPHOSPHATE, MOLECULE ENERGETIQUE MAJEURE

L'une des molécules les plus importantes parmi les transporteuses d'énergie est l'ATP, dont l'énergie lors de l'hydrolyse rend possible de nombreuses réactions chimiques au sein de la cellule. L'ATP est produite à partir d'adénosine diphosphate (ADP) par ajout d'un phosphate, selon une réaction chimique énergétiquement défavorable, alors que l'hydrolyse de l'ATP vers l'ADP fournit une quantité importante d'énergie, ce qui justifie son implication quasi ubiquitaire dans de nombreux processus cellulaires. L'ATP est notamment un carburant essentiel des pompes cellulaires et surtout, active les moteurs moléculaires responsables de la contraction du muscle.

3.3.1.2. LE NADH, LE NADPH, LE FADH2 ET L'ACETYL-COÀ SONT D'AUTRES MOLECULES ENERGETIQUES PRIMORDIALES DU METABOLISME ENERGETIQUE

Il existe d'autres molécules transporteuses d'énergie, parmi lesquelles les plus importantes sont le nicotinamide adenine dinucleotide (NAD⁺) et le nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP⁺). En effet, leur réduction en NADH et NADPH permet une forte libération d'énergie *via* le transfert d'électron et d'hydrogène ou de phosphate, ce qui les rend très importantes pour de nombreuses réactions du métabolisme. C'est aussi le cas pour la

(a)



(b)

	Complex I	Complex II	Complex III	Complex IV	ATP synthase
Total number of subunits	47	4	11	13	17
mt DNA	7	0	1	3	2
nuclear DNA	40	4	10	10	15

Figure 17 : Chaîne respiratoire mitochondriale. (a) Au niveau des crêtes, la chaîne respiratoire composée des complexes I à IV (CI, CII, CIII, CIV ; leur nom développé est indiqué au-dessous de chacun des complexes) permet le transfert des électrons fournis par le NADH, le succinate et les flavoprotéines jusqu'à la coenzyme Q qui formera l'ubiquinol (CoQH₂). Le complexe III transfère les électrons au cytochrome c dans l'espace intermembranaire qui libèrera ses électrons transférés sur l'oxygène par le complexe IV, pour former de l'eau. Ce transfert est accompagné du pompage de protons par les complexes I, III et IV, générant un gradient électrochimique qui fournira l'énergie nécessaire pour actionner le rotor moléculaire de l'ATP synthase (complexe V) et la production d'ATP. (b) Les différents complexes sont formés de plusieurs sous-unités, codées en proportion variables par les génomes mitochondrial (mt DNA) et nucléaire (d'après Bhalerao et Clandinin, 2012).

flavine adénine dinucléotide (FAD), qui peut être réduit en FADH₂. Enfin, une dernière molécule très importante dans ce transfert d'énergie est l'acétyl-CoA. Il se compose d'un groupe acétyl, facilement transférable et ayant une liaison covalente de forte énergie et un groupe coenzyme A. La partie énergétique est petite en comparaison à la grande taille du coenzyme A, qui a pour but de faciliter la reconnaissance du substrat par certaines enzymes. Cette molécule permet notamment l'ajout de deux carbones lors de la biosynthèse de grosses molécules.

3.3.2. LE CYCLE DE KREBS CONVERTIT L'ACÉTYL-CoA EN MOLECULES UTILISABLES PAR LA RESPIRATION MITOCHONDRIALE

Le cycle de Krebs prend place dans la mitochondrie chez les eucaryotes. Le groupe acétyl de l'acétyl-CoA est transféré à une molécule d'oxaloacétate pour former du citrate (ou acide citrique, d'où son autre nom de *cycle de l'acide citrique*). Cette molécule est dès lors oxydée graduellement, permettant de produire à chaque tour deux molécules de CO₂, trois de NADH, une de GTP et une de FADH₂. On obtient donc, à la fin de l'intervention de ces réactions, une grande quantité de substrats essentiels au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Il faut noter que quelques acides aminés peuvent aussi passer du cytosol vers la mitochondrie, pour former de l'acétyl-CoA ou des intermédiaires du cycle de Krebs. La mitochondrie est donc pour les cellules eucaryotes le centre énergétique par excellence.

3.3.3. LA CHAÎNE RESPIRATOIRE MITOCHONDRIALE PRODUIT DE L'ÉNERGIE VIA LE COUPLAGE OXPHOS

Le système de production d'énergie utilisé par la mitochondrie est un couplage chimiosmotique, c'est-à-dire une utilisation couplée de réactions chimiques et de transport à travers la membrane. La théorie chimiosmotique, développée par Peter Mitchell (Mitchell, 1961), postule que l'intermédiaire entre ces deux systèmes est le potentiel membranaire généré par le pompage des protons. L'énergie est produite grâce à un système à deux composants, qu'on trouve au niveau des invaginations de l'IMS. Il est constitué des différents complexes protéiques de la CR ainsi que du système de phosphorylation (l'ATP synthase et des transporteurs) (**figure 17**).

3.3.3.1. PREMIÈRE ÉTAPE : L'ÉTABLISSEMENT D'UN GRADIENT ÉLECTROCHIMIQUE ET L'OXYDATION DES SUBSTRATS ÉNERGETIQUES

Premièrement, des électrons sont transférés à travers divers transporteurs enchâssés dans la membrane, qui vont alors pomper des protons vers l'IMS et ainsi créer un gradient électrochimique. Ainsi, le NADH et le FADH₂ produits par la bêta-oxydation et le cycle de Krebs sont oxydés par la CR : le NADH par le complexe I (ou NADH déshydrogénase) et le FADH₂ par le complexe II (succinate déshydrogénase). Cette première étape d'oxydation

permet un transfert d'électrons au complexe III via l'ubiquinol (forme réduite de la coenzyme Q). Le complexe III transmet les charges électroniques au cytochrome *c* qui les relaie vers le complexe IV, qui réduit l'O₂ en H₂O.

Chacune de ces réactions est couplée à une translocation de protons de la matrice vers l'IMS au niveau des complexes I, III et IV. A cause de l'imperméabilité membranaire aux protons, un gradient est ainsi établi. En effet, le mouvement des protons génère une double force : d'abord un gradient de protons et donc de pH, mais aussi l'établissement de forces avec un gradient électrique ; on a donc l'établissement d'un potentiel de membrane à travers l'IMM, avec une matrice électronégative. Ces deux gradients ensemble permettent la création d'un gradient électrochimique (**figure 17**).

3.3.3.2. DEUXIEME ETAPE : LE GRADIENT CREE PERMET LA PHOSPHORYLATION DE L'ADP EN ATP PAR L'ATP SYNTHASE

Les protons génèrent une force protomotrice en traversant le canal du complexe V, aussi appelé ATP synthase. Ce complexe de plus de 500 kDa est formé de plusieurs sous-unités qui fonctionnent comme un rotor ; les protons passant par son canal vont permettre de faire tourner sa structure. On a un transfert de l'énergie électrique vers une énergie mécanique, qui va permettre de lier l'ADP à un groupement phosphate attaché aux têtes du complexe pour former de l'ATP (**figure 17**). L'ATP est ensuite rapidement pompée dans le cytosol, où il est nécessaire aux fonctions cellulaires. Le processus est cependant très rapide, puisqu'on estime qu'une molécule d'ATP qui vient d'être produite retournera à la mitochondrie sous forme d'ADP moins d'une minute plus tard. L'ATP synthase est optimisée pour répondre aux besoins énergétiques de la cellule, puisqu'elle produit plus de 100 molécules d'ATP par seconde, générant 3 molécules d'ATP par révolution.

3.3.3.3. LA CHAINE RESPIRATOIRE EST UN SYSTEME DE COUPLAGE OXPHOS

On comprend que la crête mitochondriale est le site d'un couplage entre réactions d'Oxydoréduction au niveau des complexes I à IV de la chaîne respiratoire et de PHOSphorylation par le complexe V : on nomme ce système OXPHOS. L'énergie mitochondriale découle ainsi d'un processus de conversion bioénergétique appelé phosphorylation oxydative. Elle est potentialisée par l'assemblage des complexes de la CR en supercomplexes, dont la stœchiométrie et la composition varient (Cogliati et al., 2013). La structure des supercomplexes est essentielle au bon fonctionnement de la CR ; leur formation stabilisation dépend de la composition en CL et de la structure de la crête.

En faisant le bilan énergétique, on note que les acides gras sont beaucoup plus énergétiques que les sucres, dans le sens où ils induisent une production supérieure d'ATP par molécule. Chaque tour de bêta-oxydation produit 14 molécules d'ATP tandis que la glycolyse anaérobie

n'en produit que deux (**figure 17**). Cet organite joue donc un rôle central et essentiel dans la production énergétique de l'organisme et des perturbations de cette production peuvent être dommageables pour l'organisme.

3.3.4. DECOUPLAGE RESPIRATOIRE PHYSIOLOGIQUE ET PATHOLOGIQUE

Le couplage est une conservation d'énergie entre l'oxydation des substrats énergétiques et la phosphorylation de l'ADP en ATP. Un défaut de couplage et donc une perte d'énergie peut participer à des phénomènes physiologiques tels que la thermogenèse et le contrôle redox ; cependant, s'il n'est pas physiologique, il peut avoir des conséquences graves pour l'individu qui ne produit plus l'énergie suffisante à son fonctionnement.

3.3.4.1. LE DECOUPLAGE PHYSIOLOGIQUE PERMET LA PRODUCTION DE CHALEUR

Dans le tissu adipeux brun, on observe un découplage physiologique qui permet de produire de la chaleur via la thermogenèse. Ce phénomène repose sur une protéine particulière appelée *Uncoupling protein 1* (UCP1), stabilisée par la CL (Lee et al., 2015). Enchâssée au sein de l'IMM, elle forme un canal qui sert de transporteurs aux protons, les faisant passer de l'espace intermembranaire vers la matrice, avec au bilan une dissipation sous forme de chaleur de l'énergie des réactions d'oxydoréduction (Ricquier and Bouillaud, 2000; Ricquier and Kader, 1976).

3.3.4.2. LE DECOUPLAGE CONSTITUE AUSSI UNE PERTE D'ENERGIE DOMMAGEABLE

En dehors du tissu adipeux brun, le découplage n'est pas physiologique et peut avoir de graves conséquences pour l'individu. Un couplage réduit dans le muscle strié est souvent dû à une diminution du fonctionnement de la CR ou à une fuite de proton à travers l'IMM (Cadenas, 2018). Ceci peut arriver dans le cas de mitochondries endommagées ou présentant des modifications structurelles ; par exemple, une crête dont la structure est compromise provoque un découplage (Cogliati et al., 2013).

4. LES MITOCHONDRIES POTENTIALISENT LA PRODUCTION

ENERGETIQUE EN S'ORGANISANT EN UN RESEAU DYNAMIQUE

Les mitochondries sont souvent représentées comme des organites tubulaires, semblables à des bactéries. Isolés, ces organites mesurent de 0,5 à 2 μm de long sur 0,5 μm de large (Frey and Mannella, 2000). Cependant, les méthodes d'imagerie ont aujourd'hui permis de mettre en évidence que ces organites *in vivo* sont plutôt de forme allongée, très dynamiques et plastiques, formant un réseau. La morphologie de ce réseau est régie par des mouvements mitochondriaux opérés à l'aide du cytosquelette, ainsi que par des événements de fusion et fission entre mitochondries (Wai and Langer, 2016). On parle de dynamique mitochondriale pour désigner ces changements continus de position, de taille et de forme des mitochondries au sein des cellules.

4.1. LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE PERMET L'ADAPTATION A L'ENVIRONNEMENT CELLULAIRE ET AUX BESOINS ENERGETIQUES DE L'ORGANISME

4.1.1. LES MITOCHONDRIES ADAPTENT LEUR SUBLOCALISATION INTRACELLULAIRE AUX REGIONS DE FORTES DEMANDES ENERGETIQUES

Les mitochondries nécessitent un contrôle très précis de leur localisation subcellulaire, puisque celle-ci leur permet de maintenir au mieux la production d'énergie et l'homéostasie de la cellule. Dans certains types cellulaires cependant, l'encombrement stérique du cytoplasme ainsi que le besoin très important de production d'ATP amènent les mitochondries à être peu mobiles, comme c'est le cas dans le muscle squelettique. La localisation des mitochondries et la morphologie du réseau mitochondrial sont donc absolument nécessaires au bon fonctionnement des mitochondries et donc au maintien de l'homéostasie et des fonctions cellulaires.

4.1.2. LES MITOCHONDRIES ADAPTENT LEUR MORPHOLOGIE EN FONCTION DE L'ENVIRONNEMENT CELLULAIRE

La masse et la morphologie mitochondriales peuvent énormément varier en fonction du type cellulaire (Liesa and Shirihai, 2013), mais aussi en fonction des conditions physiologiques afin de répondre aux besoins énergétiques et aux conditions métaboliques (Soubannier and McBride, 2009), allant d'un ensemble d'éléments cylindriques ou sphériques à une seule structure branchée, telle un réticulum. Cette masse totale peut aussi considérablement augmenter en fonction des besoins : par exemple, une cellule musculaire squelettique peut augmenter sa masse mitochondriale entre 5 et 10 fois lors du passage d'un état de repos à un état de contraction prolongée. On considère que ce réseau est généralement très interconnecté

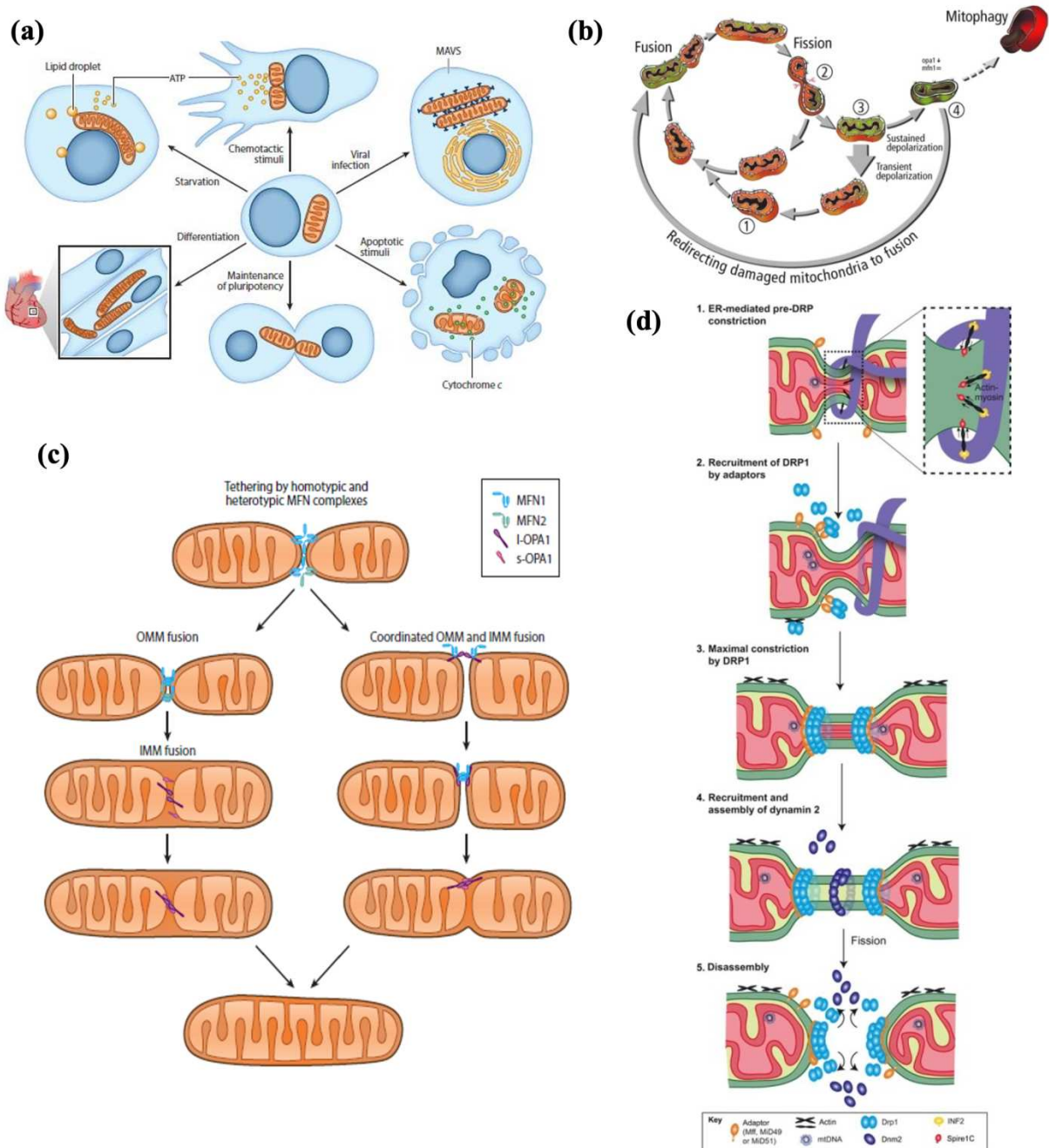


Figure 18 : Dynamique du réseau mitochondrial. (a) Le réseau mitochondrial adapte sa morphologie en fonction des besoins cellulaires (Pernas and Scorrano, 2016). (b) Il est soumis à un contrôle qualité constant et les éléments défectueux sont ainsi rapidement éliminés par une autophagie ciblée appelée la mitophagie (Twig and Shirihai, 2011). (c) Pour rendre possible cette adaptation et mitophagie, les mitochondries peuvent fusionner entre elles grâce aux mitofusines MFN1 et MFN2 et à la protéine dynamin-like OPA1 (Pernas and Scorrano, 2016). (d) Les mitochondries peuvent aussi se diviser suite à une constriction du réticulum, permettant de créer une zone de diamètre réduit où se forme un anneau de *dynamin-related protein 1* (DRP1). La protéine DNM2 se polymérise sur cet anneau de diamètre réduit et par son action GTPase, induit la scission entre les deux mitochondries (Kraus and Ryan, 2017).

dans le cas de cellules métaboliquement actives (Skulachev, 2001) et plutôt fragmenté dans le cas de cellules quiescentes (Collins et al., 2002).

Le réseau permet ainsi d'occuper l'espace cellulaire et de transmettre plus rapidement l'énergie d'un point à un autre (Skulachev, 2001). Grâce à son aptitude à rapidement transmettre des matériaux énergétiques au sein du réseau, il est considéré comme un moyen efficace de transmettre l'énergie, les molécules d'oxygène ainsi que les substrats nécessaires au fonctionnement de la CR de la périphérie vers le cœur de la cellule musculaire.

La survie et l'adaptation cellulaires reposent sur cette plasticité, que ce soit lors de la croissance, de la division ou même en réponse à un facteur stressant (Hyde et al., 2010). Par exemple, la morphologie du réseau change si les cellules poussent sur des sources d'énergie de respiration (Egner et al., 2002) ou de glycolyse (Rossignol et al., 2004). On a aussi un effet du stress oxydant (Jendrach et al., 2008) et de la nutrition (Rossignol et al., 2004). La dynamique mitochondriale participe aussi à la prolifération cellulaire, événement demandant une forte production énergétique (Liesa et al., 2009). Elle est aussi importante pour la mort cellulaire programmée (Martinou and Youle, 2006; Sheridan et al., 2008) ainsi que pour la biogenèse mitochondriale (Diaz and Moraes, 2008) (**figure 18-a**).

De nombreux cas de perturbation de la dynamique mitochondriale ont prouvé sa nécessité ; en effet, un réseau hyperfusionné ou au contraire très fragmenté ne peut répondre aux demandes énergétiques, avec des conséquences délétères sur la cellule, générant un état prémorbide (Picard et al., 2016). De plus, l'inhibition de la fusion chez la souris provoque une létalité embryonnaires (Chen et al., 2003a).

4.1.3. LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE PARTICIPE A LA MAINTENANCE DES MITOCHONDRIES ET DU RESEAU

Outre l'adaptation à la vie cellulaire, la dynamique mitochondriale permet d'éliminer des protéines ou des morceaux de membrane mitochondriale via un processus de maintenance. Ce processus est une autophagie spécifique des mitochondries appelée mitophagie. Il permet d'éliminer une mitochondrie défectueuse par fission de l'élément altéré ou de rétablir un fonctionnement normal par la fusion avec une mitochondrie saine (Twig et al., 2008).

La dynamique mitochondriale peut au contraire servir de protection contre ce mécanisme de dégradation. En effet, la fusion entre mitochondries est fortement augmentée en cas de privation en nutriments ; ce mécanisme serait un moyen d'éviter la dégradation des mitochondries par autophagie puisque les mitochondries interconnectées sont protégées (Gomes et al., 2011; Rambold et al., 2011). La fusion permet aussi, en mixant des contenus mitochondriaux, de diluer les ROS accumulés, les ADNmt mutés et participe à la repolarisation des membranes (Twig et al., 2008) (**figure 18-b**).

4.1.4. LES DEFAUTS DE DYNAMIQUE LIES A DES MUTATIONS DE L'ADNMT

Quand des mitochondries fusionnent, il y a un mélange des contenus mitochondriaux, de l'ADNmt ainsi que des membranes (Legros et al., 2002). On a observé que les défauts de fusion sont liés à une accumulation de mutations ponctuelles et de délétions de l'ADNmt (Chen et al., 2010; Rapaport et al., 1998), elles-mêmes consécutives au défaut de mélange de contenu génétique ou de dynamique mitochondriale altérée compromettant la mitophagie. La fission quant à elle est essentielle à la réplication et au transfert de l'ADNmt entre les organelles ; en effet, l'ADNmt est attaché à la face interne de l'IMM au niveau des sites de constriction de fission (Lewis et al., 2016). Tout blocage de la machinerie de fission s'accompagne donc soit d'une accumulation des clusters d'ADNmt (Ban-Ishihara et al., 2013; Ishihara et al., 2015), soit d'une diminution (Chen et al., 2015) voire d'une perte d'ADNmt (Parone et al., 2008) lorsqu'il est éliminé en raison de sa trop grande quantité ou d'une présence anormalement élevée de versions mutées. L'invalidation de plusieurs protéines impliquées dans le même processus produit une variabilité de phénotypes, appuyant la complexité du processus (Kondadi et al., 2019).

De nombreuses mutations dans l'ADNmt ont été observées dans le cadre de maladies humaines. La plupart sont hétéroplasmiques, c'est-à-dire que les ADNmt mutés coexistent au sein d'une même mitochondrie avec des ADNmt WT. La sévérité des maladies dépend souvent du ratio ADNmt WT/ADNmt muté (Grady et al., 2014; Wallace and Chalkia, 2013) ; la quantité d'ADNmt WT peut parfois, même en quantité très faible, sauver l'activité mitochondriale. Cependant, pour un même niveau d'hétéroplasmie, les phénotypes sont parfois très différents (Grady et al., 2014), montrant que les facteurs entrant en jeu dans ces affections sont complexes. La complémentation des ADNmt nécessite des échanges moléculaires entre les différentes mitochondries et donc une dynamique efficace de fusion et fission.

4.2. LES DIFFERENTS NIVEAUX DE REGULATION DE LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE

4.2.1. LE POTENTIEL MEMBRANAIRE FONCTIONNEL

La bioénergétique mitochondriale et la fusion sont indissociables et se modulent l'une l'autre. En effet, si la fusion de l'IMM dépend de protéines particulières et de l'hydrolyse de GTP, elle nécessite aussi l'établissement et le maintien d'un potentiel membranaire (Legros et al., 2002; Sauvanet et al., 2010). La fusion mitochondriale peut être maintenue en l'absence de microtubules, d'une chaîne respiratoire fonctionnelle ou même après une forte réduction de la quantité d'ATP cellulaire. Cependant, elle ne peut être maintenue en cas de dissipation du potentiel membranaire de l'IMM (Legros et al., 2002). Ce phénomène est réversible si le potentiel est rétabli. De façon intéressante, la fusion de l'OMM est indépendante du potentiel de membrane (Malka et al., 2005).

Lorsque l'état énergétique d'une cellule change, on observe une modification de la taille et du nombre de sites de contact entre OMM et IMM (Biermans et al., 1990; Knoll and Brdiczka, 1983). On note aussi qu'en cas de découplage, la dynamique mitochondriale est ralentie voire bloquée (Ishihara et al., 2003; Legros et al., 2002; Mattenberger et al., 2003) : on a une réelle interdépendance de la bioénergétique et de la morphologie du réseau.

4.2.2. LES PROTEINES, REGULATRICES MAJEURES DE LA DYNAMIQUE

La morphologie du réseau mitochondrial dépend de l'équilibre entre les mécanismes de fusion et de fission, contrôlés par des GTPases présentes sur les membranes mitochondriales. La fusion est favorisée par les protéines OPA1, MFN1 et 2 pour la fusion. La fission est favorisée par les protéines DRP1, FIS1, MFF ou DNM2.

4.2.2.1. LA FUSION DE L'OMM

Deux mitochondries proches l'une de l'autre peuvent fusionner (Meeusen et al., 2004). Provoquer la dépolymérisation des filaments d'actine entraîne un fort ralentissement de la fusion (Mattenberger et al., 2003), montrant que le cytosquelette est primordial pour l'initiation de ce processus. La fusion de l'OMM et de l'IMM dépend de protéines particulières, des GTPases. Pour l'OMM, on retrouve particulièrement les mitofusines (MFN) 1 et 2 chez les mammifères, qui sont des *dynamamin-like GTPases*. Comme toutes les protéines de cette famille, les mitofusines s'auto-assemblent, puis le GTP induit trois différents états d'oligomérisation (Chen et al., 2003b). Les MFN provoquent ainsi l'appariement des mitochondries et amorcent la fusion des OMM (**figure 18-c**). Le KO de *Mfn1* ou de *Mfn2* induit dans les deux cas une létalité embryonnaire en raison d'un défaut de formation du placenta, démontrant ainsi la nature essentielle de chacune de ces deux protéines (Chen et al., 2003a). De plus, l'invalidation de *Mfn2* amène à une réduction voire une perte du potentiel membranaire (Bach et al., 2003; Chen et al., 2003a), essentielle à la fusion de l'IMM, ce qui connecte le phénotype de létalité à une anomalie mitochondriale.

La fusion de l'OMM et de l'IMM peuvent se faire de manière séquentielle (Malka et al., 2005; Meeusen et al., 2004) *in vitro*, mais la séquence n'a pas encore été clairement établie *in vivo* (**figure 18-c**).

4.2.2.2. LA FUSION DE L'IMM

Une fois les deux OMM fusionnées, la fusion de l'IMM est permise par la protéine *Optical-Atrophy 1* OPA1 (Davies et al., 2007; Zanna et al., 2008). Sa forme longue est enchâssée dans l'IMM, au niveau de foci des régions d'interface de l'OMM, les CS et sa tête se trouve dans l'IMS (Olichon et al., 2002) ; elle possède aussi une forme courte soluble dans le cytoplasme (Song et al., 2007). Les deux sont nécessaires à la fusion et sont obtenues par

modifications post-transcriptionnelles et post-traductionnelles. En effet, l'épissage alternatif amène à différentes isoformes longues, qui sont ensuite transformées en plusieurs isoformes courtes (Akepati et al., 2008; Delettre et al., 2001), générées par clivage protéolytique de cette forme longue (Ishihara et al., 2006).

Outre son rôle fondamental dans la fusion mitochondriale, OPA1 est aussi essentielle pour la formation des crêtes mitochondriales, puisque sa déplétion amène à des crêtes dilatées.

A ces protéines majeures s'ajoutent de nombreuses protéines accessoires, qui servent d'adaptateurs, de régulateurs ou encore d'interacteurs (**figure 18-c**).

Une étude a montré que les événements de fusion sont rapidement suivis d'événements de fission (Twig et al., 2008) ; ces deux processus sont donc indissociables pour permettre de maintenir l'équilibre du réseau, qui résulte d'une balance entre ces phénomènes.

4.2.2.3. LA FISSION MITOCHONDRIALE

La fission mitochondriale est un événement demandeur en énergie et énergétiquement défavorable ; il ne peut donc avoir lieu que si cela demande plus d'énergie de rester stable ou de fusionner (Mattila et al., 2015; Sundborger et al., 2014). Comme pour tout événement de fission, la première étape de la fission mitochondriale nécessite une constriction au niveau du site de séparation des deux éléments. Ces zones peuvent avoir différents diamètres ; cependant chez l'humain, elles font généralement environ 300 nm, ce qui rend l'assemblage d'un anneau de constriction protéique impossible. Il faut donc une étape de « pré-constriction » (Morlot et al., 2012). Celle-ci est réalisée par le RE, qui s'enroule autour de la mitochondrie pour faciliter la constriction, en réduisant le diamètre du tubule à 150 nm (Friedman et al., 2011). Les contacts entre RE et mitochondries au niveau des MAMs sont donc essentiels à la fission mitochondriale (**figure 18-d**).

Un complexe protéique de constriction peut ensuite se polymériser autour de cette zone pour accroître la constriction. Ce sont essentiellement des protéines de la famille des dynamines, qui sont aussi des GTPases, qui assurent ce rôle. Une des protéines majeures qui intervient dans cette constriction est *Dynamin-related protein 1* ou DRP1 (Smirnova et al., 2001). Cette GTPase d'environ 80 kDa est cytosolique et est recrutée à la membrane mitochondriale. Les monomères de DRP1 s'oligomérisent et forment ainsi un anneau contractile (Fröhlich et al., 2013; Ingerman et al., 2005; Mears et al., 2011). Les hélices formées par DRP1 opèrent un changement de conformation suite à l'hydrolyse de GTP, amenant à une constriction deux fois plus importante (Koirala et al., 2013; Mears et al., 2011). Lors de la constriction des membranes, l'asymétrie lipidique de l'OMM et de l'IMM permet d'éviter des fusions aberrantes OMM-IMM.

L'activité GTPase de DRP1 peut être stimulée (Macdonald et al., 2016; Osellame et al., 2016) par une protéine orchestratrice de sa fixation et de son assemblage (Gandre-Babbe and van

der Blik, 2008; Losón et al., 2013; Otera et al., 2010), la protéine *mitochondrial fission factor* (MFF). On retrouve aussi *fission 1* (FIS1) (Gomes and Scorrano, 2008; James et al., 2003; Koirala et al., 2013; Losón et al., 2013), une protéine conservée, qui permet le recrutement de DRP1 dans certains cas physiologiques et certains types cellulaires.

Une fois la constriction maximale de la membrane faite, la dernière étape de la fission est une scission des deux mitochondries, effectuée par la protéine *Dynamain 2* (DNM2) (Lee et al., 2016). Cette protéine appartenant aussi à la famille des dynamines est cytosolique (figure 9-c). De nombreux processus cellulaires dépendent de DNM2, que ce soient l'endocytose ou bien les trafics membranaires intracellulaires en lien avec le cytosquelette.

Les mouvements de protéines et de mitochondries sont très dépendants de l'actine (Hatch et al., 2014), puisqu'elle permet le recrutement de DRP1 (Korobova et al., 2013). En effet, l'actine peut être précipitée avec DRP1 et elle peut directement influencer l'hydrolyse de GTP de DRP1 (Gu et al., 2010; Hatch et al., 2016; Ji et al., 2015). De plus, on sait aussi que DNM2 influence la dynamique de l'actine à la membrane plasmique (Schafer, 2004). Récemment, il a été supposé que la forme courte de OPA1 appuie la fission (Anand et al., 2014). Il a d'ailleurs aussi été retrouvé aux sites de constriction avec DRP1 et le RE, suggérant ainsi un niveau de communication entre les machineries de division de l'IMM et de l'OMM. Cependant, jusqu'à ce jour, aucune machinerie protéique de fission de la membrane interne n'a été identifiée chez les mammifères.

4.2.3. LES LIPIDES, EGALEMENT ESSENTIELS A LA DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE

4.2.3.1. LES LIPIDES DEFINISSENT LA RIGIDITE OU LA FLUIDITE DES MEMBRANES

Les phénomènes de fusion et fission se font au niveau des membranes, qui doivent avoir une fluidité et une rigidité adéquates pour cela. Ces événements requièrent des modifications de la composition lipidique des membranes, avec des lipides favorisant la fission ou la fusion (dits lipides fusogènes).

De plus, on a récemment découvert une phospholipase spécifique de la mitochondrie, *mitochondrial phospholipase D* (mitoPLD), enchâssée dans l'OMM, face dans le cytoplasme. Elle appartient à la superfamille des phospholipases D (Choi et al., 2006a) et a la particularité de pouvoir transformer la CL en acide phosphatidique (*phosphatidic acid*, PA), lipide fusogène en forme de cône favorisant ainsi la fusion mitochondriale. En effet, suite au rapprochement des mitochondries par les MFNs, mitoPLD se trouve en contact avec les CL présents à la surface de la mitochondrie opposée ; elle permet un rapprochement trans-mitochondrial plus fort via l'hydrolyse de la CL en PA. Outre ce rôle dans le rapprochement physique, mitoPLD favorise la fusion en enrichissant la membrane en PA, permettant la fusion en modifiant donc les compositions membranaires mitochondriales.

De manière intéressante, la formation de PA par mitoPLD recrute *Lipin 1b*, qui transforme PA en diacylglycérol (DAG) et provoque une fission mitochondriale (Huang et al., 2011) ; on entrevoit dès lors une des régulations possibles quant au fait qu'une fusion est suivie d'une fission.

4.2.3.2. LES LIPIDES SERVENT AUSSI DE REGULATEURS D'ACTIVITE ENZYMATIQUE

De plus, les lipides sont aussi importants par leurs interactions avec les protéines de la dynamique, qui en font des régulateurs. En effet, une expérience *in vitro* utilisant des liposomes dont la composition était similaire à l'OMM a montré qu'ils pouvaient stimuler l'assemblage de DRP1 (Lackner et al., 2009), en parallèle d'autres expériences *in vitro* montrant que DRP1 pouvait directement interagir avec des vésicules riches en CL ; physiologiquement, CL peut donc s'accrocher à DRP1, le recruter à l'OMM et stimuler son activité GTPase (Bustillo-Zabalbeitia et al., 2014; Macdonald et al., 2016).

Récemment, la conversion de la CL en PA par mitoPLD a été montré comme inhibitrice de la fission par DRP1 (Adachi et al., 2016). Ainsi, on suppose que l'augmentation de lipides saturés (comme PA) supprimerait l'activité GTPase de DRP1 et provoquerait une chute du taux de fission. On voit donc la présence de certains lipides est nécessaire ou au contraire inhibitrice de la dynamique mitochondriale

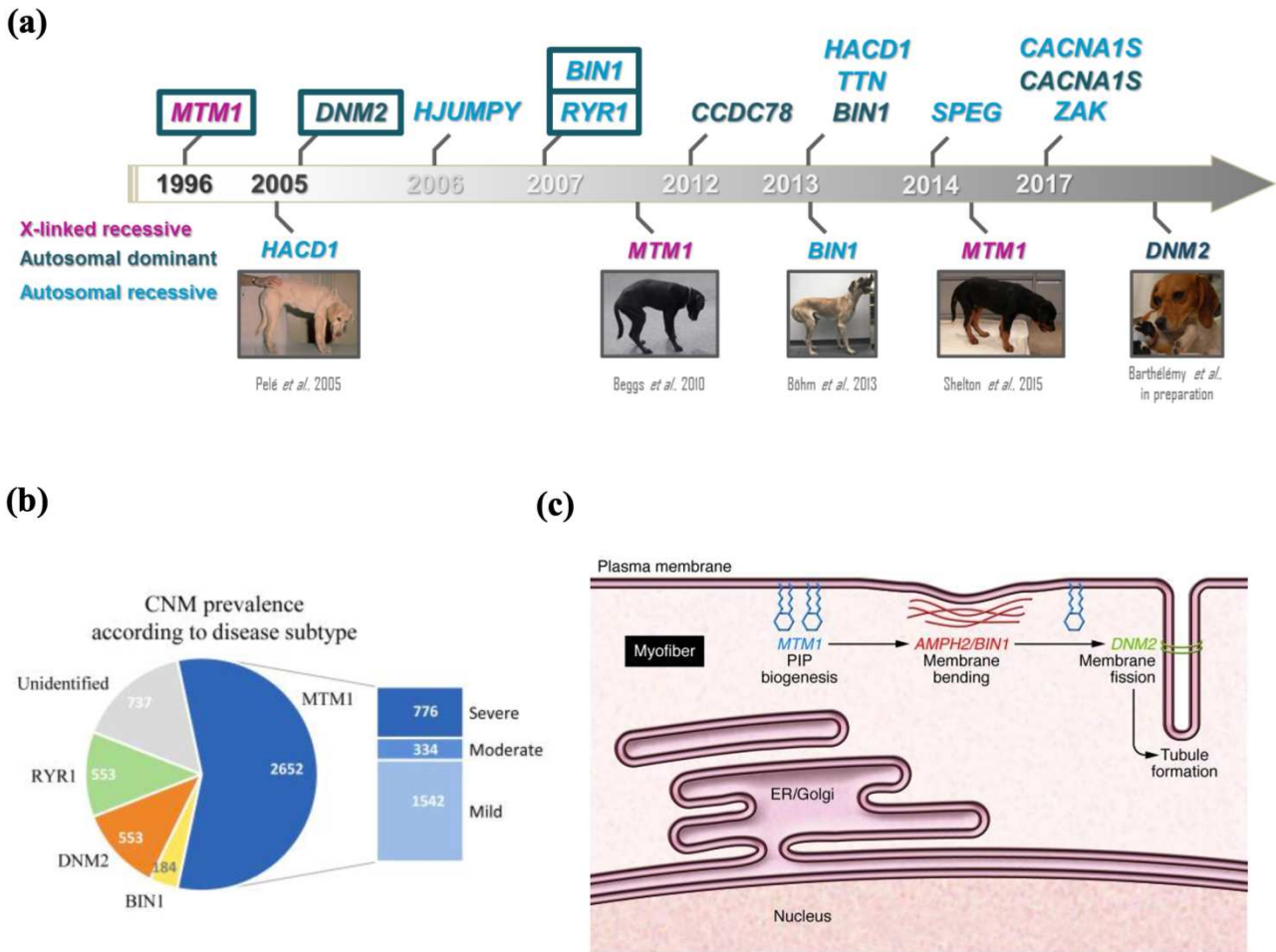


Figure 19 : Hétérogénéité génétique des myopathies centronucléaires. (a) Année d'identification chez l'humain (au-dessus) et chez le chien (au-dessous) du premier variant morbide dans la douzaine de gènes associés aux différentes formes de myopathie centronucléaire, représentées chacune par une couleur. (b) Prévalence des cas humains montrant que les variants dans les gènes *MTM1*, *DNM2*, *RyR1* et *BIN1* représentent 80% des cas identifiés de CNM (Vandermissen et al., 2018). (c) Modèle de lien fonctionnel entre les protéines codées par les gènes *MTM1*, *BIN1*, *DNM2*. Une activité GTPase réduite de la protéine *DNM2* est requise pour stabiliser des structures membranaires équivalentes au tubule t. Ceci est induit par l'interaction avec la protéine *BIN1* recrutée au tubule t par l'action de la protéine *MTM1* (Demonbreun et al., 2014).

5. STRATEGIES THERAPEUTIQUES INNOVANTES POUR SOIGNER LES CNMS ET LES MALADIES MITOCHONDRIALES

A ce jour, il n'existe pas de traitement spécifique pour les patients CNM. La compréhension de la maladie est donc primordiale pour identifier des stratégies thérapeutiques ciblées sur le contournement des mécanismes pathogènes ; pour cela, la génération de modèles de rongeurs de laboratoire est souvent envisagée, permettant à la fois de révéler les mécanismes morbides et de réaliser les premiers essais précliniques. Les stratégies thérapeutiques prometteuses et validées sur les rongeurs ne sont toutefois pas systématiquement transposables à l'humain, justifiant le recours aux modèles complémentaires dits « de grande taille », parmi lesquels les chiens atteints de myopathies congénitales spontanées qui ont fait la démonstration de leur pertinence et de leur intérêt en médecine de précision (Barthélémy et al., 2019).

5.1. MYOPATHIES CONGENITALES AVEC HYPOTROPHIE

5.1.1. LES MYOPATHIES CENTRONUCLEAIRES

5.1.1.1. HETEROGENEITE GENETIQUE DES MYOPATHIES CENTRONUCLEAIRES

Les CNM sont des maladies musculaires handicapantes et parfois mortelles. Plusieurs mutations dans différents gènes ont été associées aux différentes formes de CNM (**figure 19-a**). Les tableau clinique et l'hétérogénéité génétique de ces maladies n'a cessé de s'étendre depuis 25 ans (Jungbluth et al., 2018; Ravenscroft et al., 2015) (**figure 19-b**). Les patients présentent une faiblesse musculaire, parfois du diaphragme soutenant l'activité basale respiratoire, ce qui conduit à apporter aux patients un soutien ventilatoire mécanique temporaire ou permanent, selon la sévérité. La forme la plus grave est une forme liée à l'X, induite par des variants dans le gène codant la myotubarine (MTM1). Des variants dans les gènes *DNM2*, *amphiphysin 2 (BIN1)* ou *Ryanodine receptor 1 (RyR1)* causent des formes souvent moins sévères et d'apparition plus tardives (Claeys, 2020).

5.1.1.1.1 MYOPATHIE LIEE A UNE PERTE DE FONCTION DU GENE *MTM1*

Le gène *MTM1* code la myotubarine, une phosphoinositide phosphatase ubiquitaire impliquée dans le trafic intravésiculaire, la signalisation et l'autophagie (Nicot and Laporte, 2008). Dans le muscle squelettique, elle se localise en particulier au niveau de la citerne sarcoplasmique des triades, où elle jouerait un rôle dans la courbure membranaire de la citerne (Amoasii et al., 2013) mais également la dynamique et l'homéostasie mitochondriale (Hnia et al., 2011).

Son invalidation provoque une myopathie myotubulaire liée à l’X (*myotubularin cause X-linked myotubular myopathy*, XLMTM), un des sous-types des CNM. Cette maladie récessive touche donc exclusivement les garçons et se caractérise par un déclenchement très précoce avec une hypotonie sévère, accompagnées de faiblesse musculaire requérant rapidement un support ventilatoire. Elle est fatale avant l’âge d’un an dans environ 30% des cas (**figure 19-b**) ; il existe cependant une hétérogénéité de phénotype, avec des individus qui survivent jusqu’à l’adolescence ou l’âge adulte. Histologiquement, elle se caractérise par de nombreuses fibres immatures de petits diamètres ayant un nombre important de noyaux centralisés.

Les souris *Mtm1*-KO récapitulent les caractéristiques de la maladie humaine, telles la faiblesse musculaire progressive, la centralisation des noyaux et l’atrophie musculaire (Buj-Bello et al., 2002) ; de plus, elles ont une espérance de vie réduite de seulement 6 à 12 semaines. Elles présentent des défauts de la jonction neuromusculaire (Dowling et al., 2012), provoquant une perturbation du signal et donc des défauts du couplage excitation-contraction. Enfin, elles ont une réduction des transcrits et des protéines de nombreux intervenants du couplage excitation-contraction, ainsi que moins de relargage calcique de la part du RS, montrant que ce défaut pourrait être la cause primaire de la maladie. En parallèle, elles ont des défauts d’autophagie (Fetalvero et al., 2013) et une réduction du nombre de cellules satellites (Buj-Bello et al., 2002; Lawlor et al., 2012).

Des retrievers du Labrador atteints de XLMTM suite à une déficience en *MTM1* ont aussi été identifiés et décrits (Beggs et al., 2010) ; ils sont normaux à la naissance mais présentent une faiblesse et une atrophie musculaire à partir de 7 semaines. Des biopsies d’individus atteints âgés de 14 à 26 semaines montrent une variabilité de taille de fibres, des noyaux centralisés et des zones avec des accumulations de mitochondries, des anneaux subsarcolemmaux développés, ainsi que des accumulations centrales. De plus, le nombre de triades est réduit, peu de triades normales sont visibles. La plupart présente une orientation anormale des tubules t dilatés et une désorganisation de la triade suggérant que la myotubularine joue un rôle dans la maintenance ou la mise en place du réseau tubulaire et son fonctionnement. Les signes histologiques entre chiens et humains sont donc très similaires. La forme canine est hautement progressive, les chiens deviennent très sévèrement atteints et sont euthanasiés pour raison médicale à l’âge de quatre à six mois (Beggs et al., 2010; Mack et al., 2017).

5.1.1.1.2 MYOPATHIE LIEE A UN GAIN DE FONCTION DE LA DYNAMINE 2 (*DNM2*)

Avant d’être récemment impliquée dans la dynamique mitochondriale (Lee et al., 2016), *DNM2* a d’abord été décrite comme participant au trafic de membrane, à l’endocytose, à l’assemblage du cytosquelette d’actine et à l’autophagie (Durieux et al., 2010; González-Jamett et al., 2013). *DNM2* peut aussi se polymériser en anneaux autour des tubules et participe ainsi aux événements de fission dans la cellule.

Au niveau pathologique, un gain de fonction de la protéine DNM2 a d'abord été mis en évidence comme provoquant une CNM de manière autosomique dominante, caractérisée par une faiblesse musculaire modérée mais progressive (Bitoun et al., 2005; Böhm et al., 2012). Bien que la mutation la plus fréquemment impliquée soit p.R465W, d'autres mutations ont aussi été décrites, avec des tableaux cliniques très variables. Elles sont associées à un large spectre clinique allant des CNM commençant dans l'enfance ou l'adolescence et lentement progressives, aux formes sporadiques plus sévères avec un début néonatal (Biancalana et al., 2018). Les caractéristiques cliniques les plus fréquentes des CNM causées par DNM2 sont la faiblesse faciale et musculaire, la ptose et l'ophtalmoplégie (Bitoun et al., 2005). L'imagerie musculaire a montré une atteinte distale initiale et importante. Les études histologiques montrent souvent une centralisation nucléaire, une prédominance ainsi qu'une hypotrophie des fibres musculaires de type I et une distribution radiale du réseau sarcoplasmique (Bitoun et al., 2007).

Il est aussi à noter que certaines formes de mutations dans *DNM2* provoquent une neuropathie périphérique appelée maladie de Charcot-Marie-Tooth (Massana Muñoz et al., 2019; Tinelli et al., 2013; Züchner et al., 2005). S'il existe un chevauchement clinique entre ces deux pathologies, les patients présentent généralement un trouble tissulaire spécifique affectant le muscle squelettique ou le nerf périphérique.

Les souris homozygotes pour la mutation humaine p.R465W meurent à la naissance probablement d'un défaut d'endocytose, alors que les hétérozygotes sont viables et développent une faiblesse musculaire récapitulant le phénotype des patients (Durieux et al., 2010). Dans le TA, une altération des propriétés contractiles a été mise en évidence au sevrage et progressivement associée à une atrophie, des anomalies histopathologiques et une désorganisation intermyofibrillaire, affectant principalement la distribution des mitochondries et du réticulum, similaires à la forme humaine. L'internalisation nucléaire se produit chez la souris homozygote mais à un niveau relativement faible (10%) par rapport à la proportion observée chez les patients (jusqu'à 90% des fibres ont des noyaux centraux) et, de manière surprenante, on note une absence de centralisation nucléaire chez les souris hétérozygotes, même à 2 ans. De plus, les fibres isolées et le muscle entier des souris ont une contraction normale, suggérant que DNM2 provoque une atrophie des fibres mais pas de défaut de contraction, même si certains patients présentent des enregistrements électrophysiologiques suggérant des défauts jonctionnels (Gibbs et al., 2013). Enfin, elles ont aussi des problèmes d'autophagie (Durieux et al., 2012). Un modèle canin est actuellement en cours d'étude dans notre laboratoire.

Plusieurs études *in vitro* suggèrent que les mutations de *DNM2* provoquant des CNM seraient dues à un gain de fonction de la protéine, qui aurait une activité GTPase plus élevée et une oligomérisation stabilisée (Kenniston and Lemmon, 2010; Wang et al., 2010). Cette hypothèse est d'ailleurs appuyée par le fait qu'une surexpression de la forme sauvage de DNM2 dans un modèle murin provoque un phénotype similaire à une CNM (Cowling et al., 2011; Liu et al., 2011), potentiellement en provoquant des scissions exagérées des membranes et donc une accumulations de celles-ci autour des noyaux et des tubules t.

5.1.1.1.3 MYOPATHIE LIEE A UNE PERTE DE FONCTION EN *AMPHIPHYSIN 2 (BIN1)*

L'amphiphysine 2, codée par le gène *BINI*, est hautement exprimée dans les muscles squelettiques (Wechsler-Reya et al., 1997), avec une expression augmentée lors de la maturation des cellules musculaires (Wechsler-Reya et al., 1998). On la retrouve en particulier au niveau des tubules t (Butler et al., 1997; Durieux et al., 2010), dont elle favoriserait la biogenèse (Lee et al., 2002). C'est un facteur clé de la détection des courbures et du remodelage de la membrane plasmique dans de nombreux types cellulaires (Qualmann et al., 2011); de plus, elle pourrait participer aux événements de fission membranaire par son rôle de senseur et elle est capable de recruter des régulateurs de l'endocytose (Owen et al., 1998). En effet, la protéine contient une hélice amphipatique en N-terminal, un domaine BAR (*Bin/Amphiphysin/Rys*) qui permet de sentir et maintenir les courbures membranaires (Peter et al., 2004) et des domaines impliqués dans les interactions protéine-protéine.

Il existe plusieurs mutations autosomiques de *BINI* impliquées dans des myopathies, majoritairement récessives (Nicot et al., 2007) et parfois dominantes (Böhm et al., 2014), amenant à un spectre clinique large. Les formes récessives n'ont été identifiées que dans un petit nombre de familles présentant un phénotype faible à modéré, caractérisé par une apparition au cours de la petite enfance, avec une faiblesse musculaire progressive, une ptose palpébrale et une atrophie musculaire. Cependant, certaines formes plus sévères altérant l'épissage ont été étudiées (Böhm et al., 2010, 2013), dont une touchant une isoforme de *BIN1* spécifique du muscle, délétée de l'exon 11 qui code un domaine de fixation des phosphoinositides. La délétion de cet exon est responsable d'une CNM rapide et létale chez l'humain (Böhm et al., 2013), bien que le début des symptômes soient en moyenne vers l'âge de trois ans et demi, avec un développement moteur normal. Les patients présentent en histologie une forte atrophie, une internalisation nucléaire et une zone centrale des fibres très fortement colorée en NADH-TR, suggérant une accumulation mitochondriale anormale. Cependant, il n'y a pas de preuves d'une prédominance de fibres de type I.

Une forme similaire spontanée et très progressive a été découverte chez des chiens de race dogue Allemand (Böhm et al., 2013), apportant ainsi un modèle animal supplémentaire pour l'étude de l'affection. Les symptômes apparaissent vers 10 mois et évoluent rapidement, de sorte que les animaux sont souvent euthanasiés à 18 mois à cause d'une faiblesse musculaire sévère, empêchant notamment une activité respiratoire sans assistance ventilatoire. L'histologie montrent des noyaux centralisés ou internalisés, une structure anormale des sarcomères avec des zones centrales dépourvues de myofibrilles et des accumulations centrales de mitochondries et de granules de glycogène (Feliu-Pascual et al., 2006). Les fibres présentent aussi une prédominance de type I avec une augmentation de l'expression des gènes impliqués dans le métabolisme oxydatif (Böhm et al., 2013; Chang et al., 2010).

Les formes humaine et canine de la maladie présentent de nombreux points communs en histologie, mettant en évidence l'importance de *BIN1* dans le remodelage membranaire et la maintenance des triades du muscle. Il semblerait donc qu'une mauvaise maintenance de la

structure des triades serait la cause première de la faiblesse musculaire. Le modèle murin, quant à lui, présente aussi une CNM, avec une mort précoce chez les souriceaux homozygotes.

5.1.1.2. PLUSIEURS GENES MUTES, MAIS DES MECANISMES PATHOGENES PARTAGES

Bien que ces maladies soient dues à des mutations différentes, elles conduisent à des symptômes similaires chez les patients et des signes cliniques apparentés chez les modèles animaux. Ainsi, un défaut dans la structure des triades avec un couplage excitation-contraction anormal a été observé dans de nombreux modèles animaux ainsi que chez des patients (Dowling et al., 2009), en particulier dans les modèles mutés pour *BIN1*, *MTM1* et *DNM2* (Toussaint et al., 2011), constituant un défaut commun aux CNM et suggérant un mécanisme partagé (**figure 19-c**).

Récemment, des études ont mis en évidence que *BIN1* pouvait se lier à *DNM2* et *MTM1* (Royer et al., 2013). En effet, les muscles déficients pour *MTM1* ont une localisation anormale de *BIN1*, en dehors des tubules t (Royer et al., 2013) ; et *in vitro*, la liaison entre *MTM1* et *BIN1* favorise la formation des tubules t. La perte de *MTM1* pourrait donc amener à un défaut de biogenèse membranaire, par une régulation altérée de la localisation des phosphoinositides. De plus, *BIN1* et *DNM2* interagissent, puisqu'une forme tronquée du domaine SH3 de la protéine amphiphysine 2 empêche sa liaison et le recrutement de *DNM2* (Cowling et al., 2017). Ainsi, on peut penser que pendant le remodelage membranaire par *BIN1*, *DNM2* permettrait une organisation adéquate des triades ou bien leur maintenance via la régulation du cytosquelette.

On voit donc ainsi qu'un même mécanisme semble relier ces différentes CNM, laissant entrevoir l'idée d'un traitement commun à celles-ci (Tasfaout et al., 2018).

5.1.1.3. STRATEGIE DE LA THERAPIE UNIFIEE POUR LES DIFFERENTES FORMES DE CNM

Les maladies composant le groupe des CNM, bien qu'ayant des caractéristiques très similaires, sont donc le produit d'un nombre important de variants et qui plus est, dans des gènes différents. La correction du génome a longtemps été espérée et la découverte récente du système d'édition génomique (*CRISPR*)-related *CRISPR-associated protein 9* (*CRISPR-cas9*) ouvre aujourd'hui cette perspective, à grande échelle.

Cependant, au-delà de la vision classique d'une thérapie où l'on corrigerait chacun des variants, où chaque gène déficient serait remplacé, l'idée d'une thérapie commune à plusieurs CNM s'est imposée (Cowling et al., 2014a). La mise en évidence d'un mécanisme commun d'action entre les myopathies liées aux mutations dans *DNM2*, *MTM1* et *BIN1* permettent d'appuyer cette idée d'une thérapie commune. Il pourrait s'agir de drogues qui agissent

directement sur une protéine en amont du mécanisme commun visé – en bloquant son activité par exemple – ou bien en dégradant ou réexprimant un ARNm, en utilisant des *short-hairpin RNA* (shRNA) ou encore en empêchant sa traduction (avec la technique d'oligonucléotides antisens (*antisense oligonucleotide*, ASO). Aujourd'hui, des thérapies innovantes sont proposées pour chacune de ces stratégies, qui peuvent être administrées par une injection systémique ou par le recours à des virus adéno-associés (*adeno-associated virus*, AAV) qui cibleront le ou les organes à traiter.

5.1.1.3.1 VIA LA BAISSÉ D'EXPRESSION DE DNM2

Parmi les stratégies communes possibles, la modulation de DNM2 a été largement envisagée (Buono et al., 2018; Demonbreun and McNally, 2014; Zhao et al., 2018). En effet, on a d'abord observé que quelle que soit la mutation considérée, les mêmes défauts au niveau des triades sont observés (Toussaint et al., 2011). En parallèle, la découverte que la simple surexpression de DNM2 dans un modèle murin suffit à provoquer une myopathie suggère que sa modulation est donc suffisante pour initier la maladie. Dans le modèle murin *Mtm1*-KO, ainsi que chez les patients XLCNM, une augmentation du niveau d'expression de DNM2 a été quantifiée dans les muscles. Plus le muscle présente des signes de CNM, plus le niveau de DNM2 est élevé (Cowling et al., 2014a). Ces observations ont conduit à poser l'hypothèse que la réduction de l'expression de DNM2 corrigerait le phénotype des muscles déficients en MTM1, à condition que cette modulation ne soit pas dangereuse pour les patients. Mais alors que la perte complète de *Dnm2* est létale au stade embryonnaire, les souris hétérozygotes ne présentent pas de phénotype (Cowling et al., 2014a). À cette condition, la diminution de DNM2 en tant que stratégie thérapeutique unifiée est envisageable.

DNM2 est dominant autosomique dans le cas de la mutation p.R465W ; le modèle d'édition du génome utilisant le système CRISPR-cas9 a récemment permis de sauver le phénotype dans des myoblastes de patients et de souris, en rétablissant la forme sauvage (Rabai et al., 2019). Mais on peut aussi envisager de rétablir le niveau d'expression normal en supprimant la forme dominante mutée (Trochet et al., 2018) (puisque'une seule copie sauvage suffit à ne pas avoir de phénotype) ou bien réduire son expression. Ces deux approches ont été testées dans le modèle souris récapitulant la maladie et sauvent le phénotype, avec une amélioration de la masse musculaire, de la distribution du diamètre des fibres et des caractéristiques histopathologiques des CNM. On peut donc corriger efficacement le phénotype myopathique dû à des mutations dominantes dans *DNM2* par une diminution de son expression et ce après l'apparition de la maladie.

Cette théorie a aussi été testée dans le modèle *Bin1*-KO ; une diminution de l'expression de DNM2 chez ces souris permet un allongement de la durée de vie des souris, un rétablissement de la force musculaire, ainsi qu'une histologie similaire à celle des animaux contrôles (Cowling et al., 2017).

De même, on remarque qu'un croisement dans un modèle *Mtm1*-KO réduisant l'expression de DNM2 de manière ubiquitaire empêche l'apparition de la maladie et restaure une espérance de vie normale. De plus, la même réduction par un traitement chez des animaux sévèrement atteints amène à une amélioration de la pathologie musculaire en deux semaines (Tasfaout et al., 2017), que ce soit au niveau de la masse musculaire, du fonctionnement ou encore de l'histologie. Une diminution ciblée de DNM2 musculaire, que ce soit au niveau embryonnaire ou même après l'apparition de la maladie, permet la restauration d'une espérance de vie normale, mais uniquement dans 70-75% des individus (contre 100% dans le cas d'une diminution ubiquitaire). De plus, les souris *Mtm1*-KO montrent une surexpression de DNM2 (Cowling et al., 2014a), alors que son niveau d'ARNm n'est pas augmenté. Ceci suggère que l'augmentation de l'expression de la protéine est due à une augmentation de sa stabilité ou à une réduction de sa dégradation.

Enfin, il a récemment été observé que des souris ayant des délétions dans les micro-ARNs 133a-1 et 133a-2 développent une CNM via la régulation positive de *Dnm2* (Liu et al., 2011). *Dnm2* étant une cible directe de celui-ci, on peut imaginer une stratégie de réduction de son expression par modulation de ces micro-ARNs.

5.1.1.3.2 D'AUTRES THERAPIES POUR DES MALADIES AUX ATTEINTES MECANISTIQUES SIMILAIRES

On voit donc ici sur des modèles murins que DNM2 peut être une cible thérapeutique intéressante dans le cas de plusieurs CNMs, conférant une thérapie commune et ciblée pour ce groupe de maladie. Elle est d'autant plus intéressante qu'il existe plusieurs types de stratégies connues et utilisables dans ce but. De manière similaire à la thérapie de diminution de l'activité de DNM2, la surexpression d'une forme humaine de BIN1 dans un modèle de souris *Mtm1*-KO permet de restaurer l'espérance de vie des animaux, avec une force musculaire rétablie (Lionello et al., 2019). Cette étude apporte une nouvelle preuve que la modulation d'expression d'un gène impliqué dans une CNM est une voie thérapeutique commune pour ces maladies.

Enfin, pour une myopathie affectant une activité enzymatique de type MTM1, on peut envisager une thérapie de remplacement ou dans le cas d'atteintes des NMJ, utiliser un inhibiteur de l'acétylcholine estérase pour augmenter la présence synaptique de l'acétylcholine et ainsi favoriser la transmission de l'influx nerveux au muscle.

5.1.2. LES AUTRES MYOPATHIES CONGENITALES

Les myopathies congénitales sont des troubles neuromusculaires rares et hétérogènes, que ce soit par leurs signes cliniques, le nombre de gènes impliqués – 28 dénombrés à ce jour (Pelin and Wallgren-Pettersson, 2019). Les signes cliniques apparaissent très précocement, voire à la

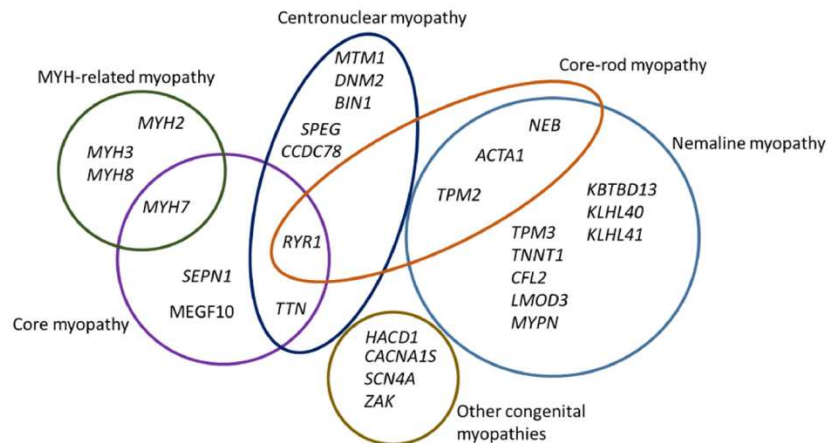
(a)

TABLE 1-3 Muscle Biopsy Features of Congenital Myopathies

Muscle Biopsy Features	Nemaline Myopathy	Central Core Myopathy	Multiminicore Myopathy	Centronuclear Myopathy	Congenital Fiber-Type Disproportion
Hematoxylin and eosin					
Fiber size variation	++	+	+	++	+++
Fiber atrophy or hypotrophy	++	-	-	++	-
Central nuclei	-	++	+	+++	-
ATPase pH 4.6					
Type 1 fiber predominance	++	+	+	++	-
Gomori one-step trichrome					
Rods	+++	+/-	-	-	-
NADH-tetrazolium reductase					
Cores	+/-	+++	+	-	-
Multiminicores	-	+	+++	-	-

- = not seen; +/- = may or may not be seen; + = infrequent; ++ = frequent; +++ = very frequent.

(b)



(c)

Gene	Membrane defects		Mitochondrial and energy metabolism abnormalities	Myofibrillar force defects	Atrophy defects	Autophagy defects
	T tubules/SR	NMJ				
<i>BIN1</i>	✓					
<i>DNM2</i>	✓	✓			✓	
<i>MTM1</i>	✓	✓	✓		✓	✓
<i>MTMR14</i>	✓				✓	✓
<i>RYR1</i>	✓	✓	✓			
<i>ACTA1</i>				✓	✓	
<i>CCDC78</i>	✓					
<i>KBTBD13</i>					✓	
<i>KLHL40</i>					✓	
<i>MEGF10</i>					✓	
<i>MYH7</i>				✓		
<i>NEB</i>	✓			✓		
<i>TPM2</i>				✓		
<i>TPM3</i>		✓	✓	✓		
<i>SEPN1</i>			✓		✓	

Figure 20 : Hétérogénéité et classification des myopathies congénitales. (a) Les myopathies congénitales ont été initialement décrites sur la base de caractéristiques histologiques, classées en quatre groupes (Iannaccone et Castro, 2013). (b) L'identification des variants génétiques associés aux diverses formes de myopathies congénitales a mis en évidence qu'une classification génétique n'était pas possible, un gène pouvant conduire, selon le variant, à diverses formes de myopathies congénitales (Pelin et Wallgren-Pettersson, 2019). (c) L'identification que plusieurs formes de myopathies congénitales partagent des mécanismes pathologiques similaires conduit à rechercher des interactions fonctionnelles entre les gènes impliqués permettant de révéler des mécanismes et voies de signalisation en commun, cibles de stratégies thérapeutiques unifiées (Ravenscroft et al., 2014).

naissance, avec une hypotonie, une faiblesse musculaire (touchant aussi les muscles du visage, surtout sa partie inférieure et la bouche). Cependant, certains patients présentent des formes très tardives, parfois même à l'âge adulte. Elles ne sont pas ou très peu progressives. Certaines formes sont associées à des troubles cognitifs ou respiratoires. Les défauts cardiaques se restreignent aux myopathies avec des mutations pour la chaîne lourde de la myosine cardiaque (*myosin heavy-chain 7, MYHC7*) ou la titine (*TTN*).

Le diagnostic se fonde sur un ensemble de données cliniques, génétiques et histologiques (colorations standards, immunohistochimie ou immunofluorescence, microscopie électronique). Toutes ces caractéristiques permettent l'établissement de cinq sous-catégories de myopathies congénitales : les myopathies à némaline, les myopathies à cores, les myopathies congénitales centronucléaires, les myopathies à core-batonnets et les myopathies apparentées à la myosine (**figures 20-a**).

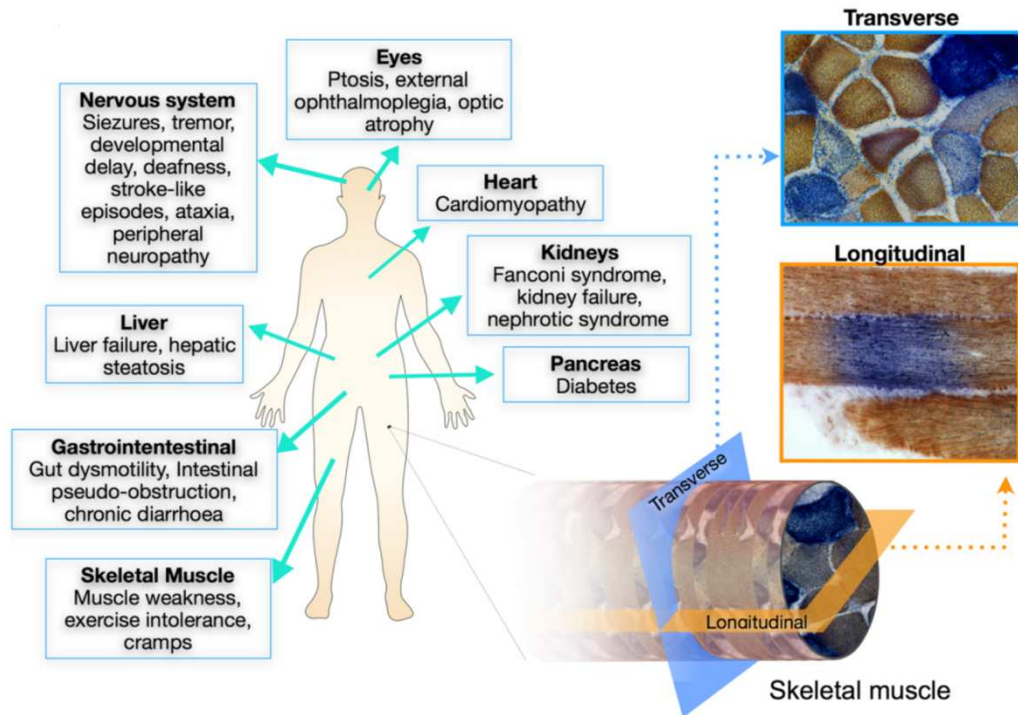
La classification reste difficile à établir : elle a d'abord été histologique, mais certaines caractéristiques se recoupent chez un même individu, qui se retrouvent entre deux classes. La tentation d'une classification génétique est envisagée : il est aujourd'hui très commun de réaliser le séquençage du génome du patient afin de connaître le gène et le variant impliqué. Mais des mutations différentes dans un même gène amènent parfois à différents signes cliniques et il arrive que deux variants dans le même gène engendrent différents types de myopathies, montrant les limites de la classification génétique (**figures 20-b**). Enfin, la classification est d'autant plus compliquée que parfois, d'un modèle à l'autre, on ne retrouve pas les mêmes marqueurs : c'est le cas entre les patients, les chiens et les souris pour HACD1. Ceci résume bien l'importance de la considération du mécanisme histopathologique, à la fois pour établir une nouvelle classification, mais aussi pour pouvoir adapter des traitements à des groupes de maladies ayant les mêmes causes primaires, loin de l'idée d'une thérapie génique personnalisée. C'est ainsi qu'on classe plutôt les myopathies congénitales selon un défaut de remodelage des membranes (provoquant des défauts de structure et de fonction du RS, des tubules t et donc des défauts de couplage excitation-contraction, mais aussi des défauts de structure de l'innervation du muscle au niveau de la jonction neuromusculaire), des défauts mitochondriaux (de localisation et de fonctionnement), des pertes de forces myofibrillaires, la présence d'atrophie ou bien des défauts d'autophagie (**figures 20-c**).

5.2. LES MYOPATHIES MITOCHONDRIALES

5.2.1. DESCRIPTION CLINIQUE

Le fonctionnement mitochondrial repose sur de nombreux processus, ce qui entraîne de nombreux points de dysfonctionnement possibles : des anomalies génétiques – de l'ADNmt mais aussi de l'ADN génomique (ADNg) –, des défauts de dynamique mitochondriale, de respiration, de bêta-oxydation... Cependant, les myopathies mitochondriales sont souvent dues à un défaut primaire de la chaîne respiratoire (Gorman et al., 2016). A ce jour, il n'existe

(a)



(b)

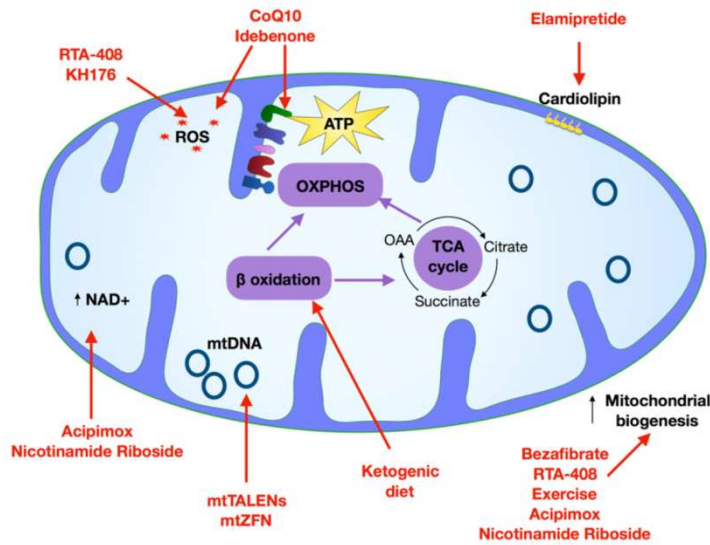


Figure 21 : Myopathie mitochondriale et atteinte multi-organes. (a) En plus des atteintes musculaires, les myopathies mitochondriales sont caractérisées par une atteinte multi-systémique résultant d'une dysfonction mitochondriale essaimant vers d'autres organes. (b) Plusieurs candidats médicaments sont aujourd'hui évalués dans des essais précliniques et cliniques en vue d'améliorer ou de guérir le phénotype morbide des patients (Ahmed et al., 2018).

pas de traitement efficace pour soigner ces maladies et seuls des traitements symptomatiques sont mis en place.

Les myopathies mitochondriales sont caractérisées par un large spectre de signes cliniques, avec des caractéristiques communes à d'autres myopathies. Les signes cliniques sont une myopathie proximale, avec une fatigue et une faiblesse musculaire variable et plus ou moins progressive. On observe parfois des atteintes des muscles respiratoires et particulièrement du diaphragme, amenant à un besoin de support ventilatoire. Les patients peuvent présenter une cardiomyopathie ou des crises d'épilepsie, expliquant la variabilité des phénotypes et surtout du pronostic médical (Gorman et al., 2016). L'ophtalmoplégie (*Chronic progressive external ophthalmoplegia* (CPEO)) est assez commune évoluant vers une paralysie des muscles oculaires combinée à une ptose. Enfin, l'exercice induit chez les patients de fortes douleurs et une fatigue prononcée (Gorman et al., 2015) (**figure 21-a**).

5.2.2. OUTILS DIAGNOSTIQUES

Le diagnostic repose sur les colorations histologiques habituelles dans le cas des myopathies, mais elles peuvent, dans certains cas, ne révéler aucune anomalie. Elles sont donc complétées par des analyses spécifiques du fonctionnement mitochondrial : le marquage trichrome de Gomori pour voir les types de fibres, notamment les fibres oxydatives, le marquage cox (cytochrome *c* oxydase, complexe IV de la CR) et le marquage SDH (succinate déshydrogénase, complexe II de la CR).

Le diagnostic est aussi complété par l'étude quantitative des activités enzymatiques des différents complexes de la CR, ainsi que l'étude de certains facteurs sanguins et sériques. En effet, les myopathies mitochondriales présentent souvent une augmentation de la lactatémie, résultat de son accumulation suite à la glycolyse pour pallier les défauts d'OXPHOS (Volpi et al., 2011). Malgré le fait que des patients adultes peuvent avoir des valeurs normales de lactatémie, c'est aujourd'hui l'un des biomarqueurs le plus prisé des médecins spécialisés pour le criblage en première intention des maladies mitochondriales. D'autres facteurs permettent d'établir le diagnostic : la concentration sanguine en FGF-21 (*Fibroblast growth factor 21*), régulateur du métabolisme lipidique, est spécifique à 90% des myopathies mitochondriales (Morovat et al., 2017) ; il en est de même pour GDF-15 (*growth differentiation factor 15*) (Yatsuga et al., 2015). Enfin, les examens diagnostiques sont souvent complétés par une étude génétique, en premier lieu de l'ADNmt, puis de l'ADNg si rien n'est trouvé et enfin du séquençage d'exons. En effet, la complexité des myopathies mitochondriales vient de la coexistence de l'ADNmt et de l'ADNg, codant tous deux des protéines nécessaires au fonctionnement mitochondrial. Ainsi, certaines myopathies mitochondriales sont génétiquement dues à des mutations de l'ADNg.

5.2.3. TRAITEMENTS

Les seuls traitements aujourd'hui disponibles sont des traitements symptomatiques. Ils reposent sur l'utilisation d'un antioxydant (Idébénone par exemple), de molécules visant à augmenter la respiration mitochondriale (comme le transporteur d'électron CoQ10, qui fait la navette entre les complexes I/II et le III), à capter les ROS comme le KH176 (dérivé de la Vitamine E), à augmenter la biogenèse mitochondriale (par le Nicotinamide riboside (Cantó et al., 2012; Khan et al., 2014) ou bien le bézafibrate qui stimule PGC1-alpha (Yatsuga and Suomalainen, 2012) ou encore la bêta-oxydation par un régime cétogène (diète riche en lipides et faible en glucide). Enfin, les défauts de dynamique lipidique peuvent être corrigés par l'Elamiprétide (précédemment appelée Bendavia, SS-31 ou MTP-31), qui stabilise la structure lipidique mitochondriale en ciblant la CL, provoquant une augmentation de l'efficacité de l'OXPPOS et donc une augmentation de la production d'ATP (Siegel et al., 2013). Cette drogue est en cours d'essai clinique sur des patients atteints de myopathie mitochondriale (Karaa et al., 2020) ou de syndrome de Barth (Reid Thompson et al., 2020) et dans les deux cas, permet une amélioration de l'intolérance à l'exercice ainsi que de la distance de marche sur un *6 min walk test* (**figure 21-b**).

Dans le cadre de la recherche de traitements curatifs, une thérapie génique de l'ADNmt est en cours d'étude (Bacman et al., 2014; Gammage et al., 2016) et particulièrement bénéfique dans le cas d'une hétéroplasmie importante (Gammage et al., 2014).

5.2.4. EXISTENCE DE DÉFAUTS MITOCHONDRIAUX EN DEHORS DES MYOPATHIES MITOCHONDRIALES

Les limites entre les différentes myopathies sont parfois difficiles à établir ; c'est pourquoi on découvre de plus en plus d'atteintes mitochondriales dans des myopathies congénitales. C'est d'ailleurs un des éléments retenus dans la classification reposant sur les mécanismes histopathologiques, car observé dans différents types de myopathies congénitales. Ainsi, on observe par exemple dans le modèle du poisson zèbre et dans des cellules de patients ayant une version mutée de *MTM1* une localisation anormale de mitochondries (Buj-Bello et al., 2008; Dowling et al., 2009). Des cellules déficientes en *MTM1* ont une quantité d'ATP et une activité du cytochrome *c* réduites, avec un réseau mitochondrial collapsé et des mitochondries élargies avec moins de crêtes (Hnia et al., 2011).

On observe aussi ces défauts dans des dystrophies musculaires. C'est ainsi que les souris *mdx*, modèle de la myopathie de Duchenne (une myopathie liée à l'X), présentent une masse mitochondriale diminuée (Godin et al., 2012), des mitochondries endommagées avec des défauts d'OXPPOS (Kuznetsov et al., 1998), de production d'ATP (Rybalka et al., 2014; Timpani et al., 2015) et de signal calcique (Godin et al., 2012; Millay et al., 2009), ainsi qu'une surproduction de ROS (Canton et al., 2014). Certaines expériences suggéreraient même que ce défaut serait primaire et suffisant à l'apparition de la maladie (Millay et al., 2009; Vila et al., 2017).

OBJECTIFS DE THESE

Les objectifs de ma thèse se déclinent en trois axes :

- 1- Une compréhension du phénotype métabolique et mitochondrial résultant de la déficience chez la souris des gènes *Hacd2* et *Hacd1*.

Ce travail est présenté dans le Chapitre 1. J'ai participé à l'évaluation de la létalité embryonnaire induite par la perte de fonction du gène *Hacd2*, ainsi qu'à l'étude du phénotype cutané chez les jeunes souriceaux exprimant faiblement *Hacd2*. Le reste de mon travail a porté sur l'évaluation de la fonction mitochondriale et métabolique chez les souris *Hacd1*-KO. Enfin, ma thèse a portée sur l'analyse de la dynamique mitochondriale dans les fibres musculaires de ces individus.

- 2- Caractérisation du phénotype mitochondrial chez des souris dont la déficience en HACD1 est induite à l'issue de la période du développement musculaire.

Ce travail est présenté dans le Chapitre 2. Le but de cette partie est de tester s'il est possible d'induire un découplage spécifique du muscle squelettique en diminuant l'expression d'*Hacd1* au-delà de sa période de croissance dépendant de la fusion. J'ai initié cet objectif en réalisant d'une part une étude pilote d'injection d'AAV contenant un *short-hairpin* ARN contre *Hacd1*, d'autre part à l'aide d'un modèle de délétion conditionnelle d'*Hacd1*.

- 3- Interaction génétique avec *Hacd1* et essai de sauvetage de la myopathie

Ce travail est présenté dans le Chapitre 3. Il se concentre sur l'hypothèse d'une interaction génétique d'une part entre *Hacd1* et *Dnm2*, impliqué dans une myopathie centronucléaire, d'autre part entre *Hacd1* et *Cd9*, impliqué dans la fusion des myoblastes. Ces projets visent à mettre en évidence un éventuelle sauvetage phénotypique, permettant d'envisager ultérieurement une thérapie pour la déficience en *Hacd1*.

MATERIEL ET METHODES

NB : cette partie est présentée en anglais car elle constitue le matériel et méthodes qui composera les articles à venir.

Mice

Experiments on mice were approved by the Anses/EnvA/Upec Ethics Committee: for *Cd9* #18984-2019020623075519 v1, for *Dnm2* #18985-2019020622324126 v1, for *Hacd1* experiment #9535-2017040717338983 v5 and #26147-2020062222122801 v3.

All care and manipulations were performed in accordance with national and European legislation on animal experimentation. Studies were carried on male and female mice that were housed in stainless steel cages containing environmental enrichment, in rooms maintained at 22 ± 1 °C with an air change rate of 12 vol/h and lit from 7 am to 7 pm. Food and water were given ad libitum unless otherwise stated. *Hacd1*-knockout (*Hacd1*-KO) mice were generated as previously described (Blondelle et al., 2015). Food was either a normal diet (ND, 3188 kcal/kg from carbohydrates (64%), proteins (24%) and fat (12%); maintenance diet for mice #C1324, Altronim) or a high-fat diet (HFD, 5241 kcal/kg from fat (60%), carbohydrates (23%) and protein (17%); Diet-Induced Obesity-Diet #C1090, Altronim). Mice assessed for body mass gain under HFD were housed individually and mice were weighted each week. Mice were euthanized by cervical dislocation. The fast-twitch glycolytic superficial gastrocnemius, slow-twitch oxydative muscle *soleus*, fast-twitch glycolytic EDL (*extensor digitorum longis*) and fast-twitch oxydative glycolytic (mixed) tibialis anterior (TA) muscle were used to provide a representative panel of muscles with different myofibre composition. Muscles from both legs were sampled and weighted to do a mean muscle mass presented on each graph. In the HFD study, white adipose tissue (WAT) refers to the whole gonadal WAT. After sampling, muscles were either snap-frozen in liquid nitrogen for protein, RNA or DNA extraction, or were snap-frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen for muscles cryosectioning upon storage at -80 °C.

Molecular biology

Extraction of total RNA, RT-PCR and RT-qPCR analyses

Samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Total RNAs were isolated using TRIzol reagent (Sigma) according to the manufacturer's protocol. Purity of RNAs was assessed by a ratio of absorbance at 260 nm and 230 nm >1.7. RNA quality was checked on agarose gel. One microgram of RNA was used for reverse transcription with the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas). cDNAs were amplified using the Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X; Fermentas). qPCR reactions were performed on a Roche Light Cycler system (Roche).

All PCR and qPCR products were examined qualitatively on agarose gels. RT-qPCR results were normalized by a reference gene, *Rpl32*. Sequences of primers are listed in Annex 2. For recombination quantification in the study with conditional *Hacd1* deletion, combination of specific primers is listed in Annex 1, along with the *Hacd1* locus representation with primers position in Annex 2.

Western blot experiments

Samples preparation for all western blot (except HACD1)

Frozen tissues were lysed in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid), supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Pierce), using a Precellys homogenizer (Bertin). Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce). Protein extracts (10 µg) from either superficial gastrocnemius, EDL, soleus muscles, TA or isolated mitochondria and mitoplasts were denatured in loading buffer (300 mM TrisHCl, 500 mM sodium dodecyl sulfate, 50% Glycerol, Bromophenol blue) + β-mercaptoethanol for 5 min at 95 °C.

Samples preparation for HACD1 western blot

[Samples were depleted in actin and myosin to concentrate HACD1 and denaturation was performed at RT with iodoacetamide to facilitate denaturation of HACD1 that harbors 6 transmembrane domains.]

Frozen tissue were lysed in lysis buffer (300 mM KCl, 30 mM PIPES pH 6.6, 10 mM Na-Butyrate, 0,5% IGEPAL) supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Pierce), using a Precellys homogenizer (Bertin). Samples were centrifuged at 15000 g for 10 min at 4 °C, and supernatant was transferred to a new tube. This fraction was diluted at 1:4 in an ice-cold dilution buffer (10 mM Na-Butyrate, 0.5% IGEPAL) supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors and inverted several times. Samples were centrifuged at 15000 g for 10 min at 4°C, and supernatant protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce). Protein extracts (10 µg) from either tissue were denatured in loading buffer (300 mM Tris HCl ph 6.8, 500 mM SDS, 50% glycerol and bromophenol blue) with 100 mM DTT for one hour at RT. Iodoacetamide was added to each sample to a final concentration of 50 mM, and incubated for an additional hour protected from light at RT.

Samples migration, transfer, hybridation and revelation

Denatured extracts were loaded on Bolt™ 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen), separated for 22 min at 200 V and subsequently transferred to PVDF membranes using transfer stack and iblot2 system for 7 min at 20 V (Invitrogen). Thereafter, blots were blocked for one hour in 2.5% gelatin in Tris Buffer Saline-Tween (20 mM Tris, 150 mM NaCl, 0.1% Tween, pH 7.4) at room temperature, followed by incubation with different primary antibodies, overnight at 4 °C. After washing, membranes were incubated with the appropriate secondary antibodies for one hour at room temperature and revealed using the West Femto chemiluminescent substrate (Pierce). Light emission was recorded using a chemiluminescent detection system (G-Box, Syngene) and quantified by the ImageJ software (v1.47, NIH). Protein content was normalized to either β -actin, Cox IV, GAPDH or β -tubulin. Antibodies references and dilution rate are listed in Annex 3.

Extraction of total gDNA and mtDNA

Total DNA was extracted from TA of adult (8 months old) and old (22 months old) mice. Briefly, muscles were minced in 500 µl of lysis buffer (10 mM TrisHCl, 10 mM NaCl, 25 mM EDTA, SDS 1%, 0.4 mg/ml proteinase K, pH 7.5) with cleaned scissors and incubated overnight at 37°C. After addition of 50 µl of saturated (5 M) NaCl solution, the homogenates were centrifuged at 500 g for 15 minutes. Isopropanol (500 µl) was added to supernatants

which were then incubated 45 min at -20 °C. After a centrifugation at 16000 g for 20 min, the pellets were kept, washed with ethanol 70%, resuspended in resuspension buffer (10 mM Tris HCl, 1 mM EDTA, pH 8) and finally warmed at 70 °C for 10 min.

Evaluation of mtDNA and gDNA content

mtDNA content was measured by real-time qPCR using specific primers for a mitochondrial gene (Dloop) and a nuclear gene (B2M, Beta-2 microglobulin). The real-time PCR thermocycling conditions were 2 min at 50 °C, 10 min at 95 °C, and 45 cycles of 15 s of denaturation at 95 °C and 30 s of annealing/extension at 62 °C. The difference between the threshold cycle (Ct) of genomic gene and mitochondrial DNA gene (Δ Ct) was used to assess the mtDNA/gDNA ratio, which was calculated using the following formula: $2^{(2-\Delta Ct)}$. This value was then normalized to the initial quantity of total DNA done per gene (0.4 ng per well for Dloop and 2000 ng per well for B2M).

Determination of deletions in mtDNA

To determine the size of mtDNA fragments in TA muscles, Long-Range PCR on 12 mice mtDNA samples was performed using a pair of primers on D-loop sequences on the mtDNA that did not show sequence similarity with genomic DNA. Long-Range PCR using these primers covered the whole of the 16,229 bp of the mitochondrial genome. We performed the PCR with thermal cycling conditions as follows: one 1-min cycle at 96 °C, 35 cycles of 10 s at 96 °C, 15 s at 58 °C, and then 16 min 20 s at 68 °C, one 10-min cycle at 68 °C, and then storing of PCR products at 4 °C. PCR products were run on a 0.5% agarose gel at 90 V for 2.5 hours before UV-revelation.

Functional evaluation

Treadmill tests

The running capacity was evaluated on a treadmill (Panlab, Model LE8710MTS) at a +4% slope. All mice were initially acclimatized to the treadmill for 5 days (10 min/day, 12 m/min; Annex 4). The maximal aerobic speed was determined by challenging mice to an exercise of

progressively increasing intensity. Speed was progressively increased according to maximal aerobic speed program (Annex 5) and the speed of the last completed running step before exhaustion was considered as the individual MAS value. Endurance capacity was determined by challenging mice to a submaximal exercise intensity (60% of the maximal aerobic speed) until exhaustion.

Glucose tolerance and insulin sensitivity test

The glucose tolerance test was performed in mice fasted overnight for 16 hours prior to an intraperitoneal injection of a 40% glucose in double distilled water at a dose of 3 g of glucose per kg of body mass for ND-fed mice.

The insulin sensitivity test was performed in mice fasted overnight for 6 hours prior to an intraperitoneal injection of insulin (Umuline Rapide, Lot C755344) in normal saline solution at a dose of 0.8 units of insulin per kg of body mass for ND-fed mice.

Blood was sampled from the tail vein just before the injection (T0) and then after 30, 60, 90 and 120 min in order to assay blood glucose concentration (Glycemia; Contour XT glucometer; Bayer).

Mitochondria assays

Isolation of mitochondria from TA muscle (for every mitochondria extraction except for mitochondrial fusion assay)

Tibialis anterior muscles were quickly collected after euthanasia of mice in ice-cold PBS (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10 mM EDTA; muscle samples were then minced with scissors, rinsed and incubated in 5 ml of ice-cold PBS supplemented with 10 mM EDTA and 0.05% trypsin for 30 min, followed by a centrifugation at 200 g for 5 min. Pellets were suspended in Isolation Buffer 1 (67 mM sucrose, 50 mM KCl, 10 mM EDTA, 0.2% BSA and 50 mM Tris-HCl, pH 7.4) and homogenized with a Dounce homogenizer (Sigma). Mitochondria were purified by a differential centrifugation at 700 g for 10 min, and mitochondria-containing supernatants were then centrifuged at 8,000 g for 10 min. The crude mitochondrial pellet was resuspended in an appropriate volume of Isolation Buffer 2 (250 mM

sucrose, 3 mM EGTA and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4). Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce). Every centrifugation step was performed at 4 °C.

Isolation of mitochondria from whole-body skeletal muscles for mitochondrial fusion assay

Whole-body skeletal muscles were quickly collected after euthanasia of mice in ice-cold PBS (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10 mM EDTA; muscle samples were then roughly minced with scissors, rinsed, transferred into 40 ml Isolation Buffer 1 (310 mM sucrose, 20 mM Tris-HCl, 1 mM EGTA, pH 7.2), and homogenized with an ultrathurax homogenizer (Polytron). Mitochondria were purified by a differential centrifugation at 1,200 g for 10 min, and mitochondria-containing supernatants were then filtered through a 100 µm filter and centrifuged at 8,000 g for 10 min. A wash in 20 ml of Isolation Buffer 1 was performed and the crude mitochondrial extract pelleted by a 8,000 g centrifugation for 10 min. Then, the mitochondria pellet was resuspended in an appropriate volume of Isolation Buffer 2 (250 mM sucrose, 3 mM EGTA and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4). Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce). Mitochondria were then aliquoted and pelleted by a 8,000 g centrifugation for 10 min and resuspended in Isolation Buffer 2 + 10% glycerol, snap-frozen in liquid nitrogen and kept at -80 °C. Every centrifugation step was performed at 4 °C.

Respiration measurement on isolated fibres

The mitochondrial respiration was studied *in vitro* in saponin-skinned fibres. Briefly, fibres from 6-mo-old mice were separated under a binocular microscope in solution S (2.77 mM CaK₂EGTA, 7.23 mM K₂EGTA, 20 mM taurine, 0.5 mM DTT, 20 mM imidazole, 50 mM potassium-methane sulfonate, 5.7 mM Na₂ATP, 15 mM creatine-phosphate (final solution: pH 7.1, 160 mM ionic strength, 100 nM free Ca²⁺, 1 mM free Mg²⁺)) on ice and then permeabilized in solution S containing 50 µg/ml of saponin for 30 min at 4 °C. After being placed 10 min in solution R (2.77 mM CaK₂EGTA, 7.23 mM K₂EGTA, 20 mM taurine, 0.5 mM DTT, 20 mM imidazole, 3 mM phosphate, 90 mM potassium-methane sulfonate, 10 mM sodium-methane sulfonate and 2 mg/ml fatty acid-free bovine serum albumin, (final solution: pH 7.1, 160 mM ionic strength, 100 nM free Ca²⁺, 1 mM free Mg²⁺)) to wash out adenine nucleotides and creatine phosphate, skinned separated fibres were transferred in a 3 ml water-jacketed oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments) equipped with a Clark

electrode, as previously described (Kuznetsov et al., 2008), under continuous stirring. After the experiments, fibres were harvested and dried, and respiration rates expressed as $\mu\text{moles of O}_2$ per min and per g of dry mass.

Measurement of the maximal muscular oxidative capacities

After the determination of basal respiration rate measured at 22 °C with R solution plus 1 mM pyruvate and 4 mM malate as mitochondrial substrates (V_0 , non-phosphorylating rate), fibres were exposed to an increasing concentration of ADP to determine the apparent K_m for ADP and maximal mitochondrial respiration (at saturating concentration of ADP (2 mM) V_{max} , phosphorylating rate). The ratio of V_{max}/V_0 represented the degree of coupling between oxidation and phosphorylation of ADP for pyruvate.

Respiration measurement with Seahorse device

Fresh TA were weighted and samples of around 20 mg were homogenized in a glass homogenizer in the assay medium (70 mM sucrose, 220 mM mannitol, 10 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , 2 mM HEPES, 1 mM EGTA, 0.2% BSA; pH 7.2) containing substrates for Complex I (10 mM pyruvate, 2 mM malate, 10 mM glutamate) and 2 mM ADP. Homogenization was performed in a Dounce homogenizer (Sigma). Homogenates were filtered through a 100 μm filter and transferred to XF-V7 24-well plates (Seahorse Bioscience) at a 1/10 dilution. Plate was spun down for 20 min at 2000 g, 4 °C, then let to equilibrate for 1 hour at 37 °C in a non- CO_2 incubator. The oxygen consumption rate (OCR) was determined at 37 °C with complex I substrates and ADP and then after subsequent addition of 10 mM succinate, 2 μM oligomycin, 20 μM FCCP and 6 μM antimycin A. At the end of the run, cells from the wells were collected by up and down pipetting, transferred into tubes, and centrifuged to discard the supernatant. Two successive washes of the pellet were done with PBS, then protein quantification was performed using the bicinchoninic acid assay (Pierce) to normalize respiration values.

Mitoplast preparation

Freshly isolated mitochondrial pellets were incubated in 1 ml of H300 Mitoplast Buffer (70 mM sucrose, 220 mM mannitol, 2 mM Hepes, pH 7.4) supplemented with 0.05% BSA

and 0.12 μg (and 1.2 μg for test) of digitonin per μg of mitochondrial protein, for 15 min at 4 °C (and RT for test), with gentle shaking. Mitochondria were centrifuged at 8,000 g for 5 min and pellets were incubated in 1 ml of H40 Mitoplast Buffer (H300 buffer diluted 7.5 times in distilled water) for 15 min at 4 °C, with gentle shaking. Suspension was then homogenized with a dounce homogenizer (Sigma) and centrifuged at 8,000 g for 5 min. Pellets were resuspended in 1 ml of H40 buffer and centrifuged at 8,000 g for 5 min. Pellets were resuspended in 50 μl of Isolation Buffer 2 and protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce).

In vitro mitochondrial fusion

For the isolation of muscle cytosol, both gastrocnemius muscles from a WT mouse were sampled in ice-cold PBS supplemented with 10 mM EDTA, minced with scissors, rinsed and incubated in 5 ml of ice-cold PBS supplemented with 10 mM EDTA and 0.05% trypsin for 30 min at 4°C, followed by a centrifugation at 200 g for 5 min. Pellets were resuspended in mitochondrial fusion buffer (10 mM HEPES pH 7.4, 110 mM Mannitol, 68 mM sucrose, 80 mM KCl, 0.5 mM EGTA, 2 mM $\text{Mg}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, 0.5 mM GTP, 2 mM K_2HPO_4 , 1 mM ATP, 0.08 mM ADP, 5 mM sodium succinate and 1 mM DTT) and homogenized with a Dounce homogenizer (Sigma). The extract was then centrifuged at maximal speed for 10 min three times and 30 min once, each time with a transfer of the supernatant to a new tube. Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce), and extract was aliquoted and kept at -80 °C. Every centrifugation step was performed at 4 °C.

For mitochondrial fusion, 100 μg of mitochondria extracted from whole-body muscle were thawed on ice, centrifuged at 8000 g and a fraction (unfused mitochondria) was resuspended in Isolation buffer 2 (250 mM sucrose, 3 mM EGTA and 10 mM Tris-HCl, pH 7.4), and the rest in fusion buffer with or without 5 mg/mL cytosol. Mitochondria were concentrated by centrifugation at 9000 g for 2 min and incubated on ice for 30 min. The mixture was then resuspended in mitochondrial fusion buffer and warmed to 37 °C for 5, 10, 15, 20 et 30 min, and then centrifuged at 8000 g for 10 min before resuspension in 50 μl of 100 nm-filtered Isolation Buffer 2. The preparations were then diluted at 1/100 in 400 nM MitoTracker Green FM (Invitrogen) and fluorescence was assessed with an LSR Fortessa flow cytometer with a small-particle option for nanoscale cytometry (BD Biosciences). This option consists of photomultiplier (PMT)-coupled forward scatter (FSC) detection. The performance of the flow

cytometer was checked with two size standard particle kits for flow cytometry: BioCytex (Megamix gate: 300 nm, 500 nm and 900 nm) and Spherotech (Nano Fluorescent Size Standard kit, 220 nm, 450 nm, 880 nm, and 1350 nm). These kits were used to standardize FSC-PMT parameters for definition of the microparticles (MP) gate and evaluation of the background noise of the machine outside the MP gate (100 nm filter PBS). MPs were acquired at low speed: 200 events/second. Analyses were performed using FlowJo 10 and Excel.

Mitochondrial membrane rigidity

Mitochondrial membrane rigidity was estimated by fluorescence anisotropy (r) as described (Bastiaanse et al., 1995; Le Borgne et al., 2012). Rigidity measurements were conducted using 1- (4-Trimethylammonio-phenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene p-toluenesulfonate (TMA-DPH, Sigma Aldrich) as a probe to monitor physical properties of mitochondrial membranes. TMA-DPH is composed of a cationic substitute (TMA) that anchors at the polar heads of the membrane, while allowing the fluorescent hydrophobic probe DPH to be located in nonpolar regions. In polarized excitation light, a high rigidity value reflects increased rotational lifetime of DPH that happens when DPH orientation is stabilized in less fluid membranes.

Mitochondria suspension (72 μ g) was placed into a 1 cm path length spectroscopic quartz cuvette (VWR International, Limonest, France). The mitochondria were stirred and maintained in a thermostatically controlled chamber. After 6 min at 37 °C, 2 μ l of the fluorescent probe TMA-DPH (1 mM in tetrahydrofuran) were added to label mitochondrial membranes. Rigidity was measured at 37 °C 10 min after addition of the probe; after this first series of measurement, the temperature of the chamber was gradually reduced and anisotropy was measured at 35, 30, 25, 20, 15, 10 and 5 °C. Data were expressed as mean \pm s.d of three independent experiments, each from different mice.

Electron microscopy

Sample preparation and acquisition

After euthanasia of mice, muscle tension and position were normalized by pinning the entire skinned hindlimb on a paraffin-coated dish, with the metatarsus making an angle of 90 degree

with the tibia. The limb was then fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, at room temperature for 4 h. Muscles were cut in small pieces and kept overnight in the same fixation buffer at 4 °C. Samples were then processed at the Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods MIMA2 platform, INRAE, (<https://doi.org/10.15454/1.5572348210007727E12>). They were contrasted with Oolong Tea Extract 0.5% in cacodylate buffer; postfixed with a solution of 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium cyanoferrate; gradually dehydrated in ethanol (30% to 100%) and substituted gradually in a mix of propylene oxide-epon and embedded in Epon (Delta microscopy). Thin sections (70 nm) were collected onto 200 mesh copper grids, and counterstained with lead citrate. Grids were examined with a Hitachi HT7700 electron microscope operating at 80 kV (Elexience). Images were acquired with a charge-coupled device camera (AMT).

Transmission electron microscopy - images analysis

For mitochondrial contacts quantification, images at x 12,000 magnification were analyzed using Stereology EM software. Briefly, the software traced a mask of arcs of a circle over the images. We then selected a category (no contact, contact with cytoplasm, ER, myofibrill, etc...) for each arc of a circle that contacted mitochondria, one by one. Mean ER contact number was assessed by dividing the number of ER-mitochondria arcs contacts with the total number of arcs contacts for mitochondria. For each animal, a minimum of 20 images was measured for the soleus muscle. All images were analyzed in a blinded manner and represented using Graphpad.

Optical microscopy

Fibres isolation by manual isolation

EDL muscles were sampled and collected in solution S (2.77 mM CaK₂ EGTA, 7.23 mM K₂ EGTA, 6.56 mM MgCl₂, 5.70 mM Na₂ATP, 20 mM Imidazole, 20 mM Taurine, 500 μM DTT, 15 mM phosphocreatine, 50 mM potassium-methanesulfonate). They were then manually dissociated under binocular microscope in solution 1 (10 mM K₂ EGTA, 4.9 mM MgCl₂, 3 mM K₂HPO₄, 54.2 mM potassium-methane, 500 μM DTT, 3.6 mM Na₂ATP, 12 mM Na₂PCr, 10 mM glutamate, 4 mM malate, 60 mM BES, 20 mM Taurine, 6% dextran)

using very precise forceps, sharpened under a binocular magnifying glass before each experiment. They were separated into bundles of fibres, carefully manipulated by a bundle extremity and fixed in 4% PFA at room temperature for 20 min. They were rinsed twice in PBS and kept at 4 °C before staining and imaging.

Fibres isolation by chemical isolation

The experiment was realized in six sessions. Each session was done on two mice, a WT and a *Hacd1*-KO. Complete extensor digitorum longus (EDL) muscles were immediately removed with their two tendons, and enzymatic dissociation was performed using 0.2% Type I Collagenase from *Clostridium histolyticum* (Sigma-Aldrich,) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 mg/ml) (DMEM + P/S medium) at 37 °C in 5% CO₂/95% air for 2 h. Muscles were then transferred in six-well plates coated with 5% Horse Serum in DMEM + P/S medium and let for 20 min at 37 °C. Fibres were isolated by medium flushes using a Pasteur pipette to dissociate cells from the muscle. Fibres were then collected individually to select the non-contracted fibres and discard the contracted ones. Three washes in different wells were done to remove collagenase and contracted fibres. Fibres were let overnight in a 37 °C incubator with 5% CO₂.

Mitochondrial network visualization on isolated myofibres

Non-contracted fibers were transferred in 35 mm iBidi (iBidi) μ -dishes coated with Matrigel (ThermoFisher, 1/1000 dilution) and let to adhere for 1 h at 37 °C. Fiber staining was realized in 2 ml of DMEM + P/S medium at 37 °C. Fibres were stained with 200 nM MitoTracker Green FM (Invitrogen) in DMEM + P/S for 90 min at 37 °C. Imaging was performed on LSM 510 META (Zeiss) (40X) in a 37 °C-thermostated chamber with 5% CO₂. For every mouse, z-stacks were performed on three fibers. Mitochondrial volumes on MitoG z-stacks were analysed with the Object Counter 3D plugin in ImageJ to calculate the volume of MitoG-positive objects.

Mitochondrial network visualization on primary myoblasts and myotubes

Primary myoblasts were obtained by dissection of hindlimb muscles from 5 to 7-day-old WT and *Hacd1*-KO pups. Muscles were digested in DMEM containing 0.5 mg/ml collagenase

(GIBCO 17101) and 3.5 mg/ml dispase (GIBCO 17105) for 2 h at 37 °C. Cell suspension was filtered through a 40 µm cell strainer and pre-plated in DMEM + 15% fetal bovine serum (FBS) for 4-5 h at 37 °C, 5% CO₂. Non-adherent myogenic cells were collected and plated in DMEM (GIBCO) + 20% FBS onto iBidi dishes (iBidi) coated with collagen (Sigma). Differentiation was triggered by changing the culture media to DMEM + 2% of horse serum for 2 days. For treatment conditions, primary undifferentiated or differentiated cells were incubated with 50 µM mdivi-1 (Sigma) for 1 hour before fixation. Fixation was done on myoblasts or myotubes with formol at room temperature for 15 min, then washed three times with PBS. Fixed samples were treated in 50 mM NH₄Cl for 10 min, washed 3 times in PBS and permeabilized in 0.1% Triton-X100 for 10 min. They were then blocked in 10% FBS for 30 min and incubated overnight at 4 °C with an anti-TOM20 antibody, washed three times in PBS, incubated for one hour with an anti-mouse secondary antibody. Samples were imaged on LSM780 (Zeiss) at 63x. Analysis was done using Icy software and Excel.

Proximity ligation assay on muscle sections

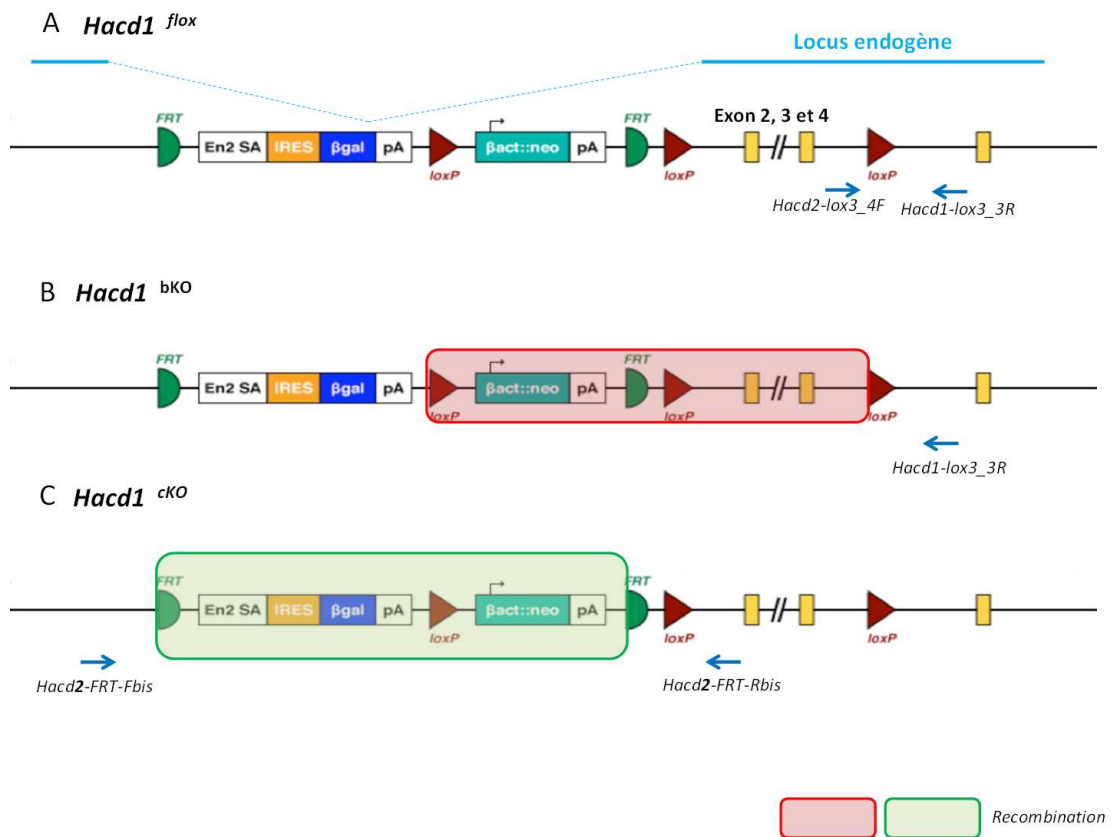
TA muscle sections of 7 µm were used to assess mitochondria-ER contacts using Proximity Ligation Assay (PLA, Sigma) following the manufacturer's instructions. Briefly, sections were blocked for 30 min in blocking solution (Sigma) in humidified chamber. They were then incubated with mitochondrial (VDAC, produced in mouse) and ER (IP3R, produced in rabbit) primary antibody overnight. After two washes in PBS, sections were incubated with anti-mouse and anti-rabbit PLA probes for 60 min in humidified chamber at 37 °C. After two washes in buffer A, ligase was added in ligation buffer and incubated for 30 min at 37 °C. Samples were then incubated for 100 min with polymerase in amplification solution at 37 °C, washed and dried at room temperature before a final incubation at 37 °C in humidified chamber. After mounting, images were acquired on Observer Z1 equipped with Apotome module (Zeiss) at 40x. Experiment was conducted on three individuals per genotype, on 20 to 30 images per section. Density of dots per image were counted using Fiji software, and analyses were conducted on Graphpad Prism.

Quantification and statistical analysis

All data are presented as mean of values measured on distinct samples ± s.d. Data were analysed using Graphpad. Raw data from each individual experiment were evaluated using an

unpaired two-tailed t test with 95% confidence. For datasets that did not pass the D'Agostino and Pearson omnibus normality test ($\alpha = 0.05$), differences were evaluated using a two-tailed unpaired non-parametric Mann-Whitney test with 95% confidence. Multiple pair wise tests were corrected using Holm-Bonferroni method. Variance equality was analyzed by F test, and comparisons between groups were carried out using Analysis of variance with genotypes of mice (WT or *Hacd1*-KO mice), food, injection/no injection and their interactions as factors followed by post hoc Tukey test. Differences between groups were considered significant if the P value was less than 0.05.

ANNEX 1: *Hacd1* genetic constructs and primers.



Recombination rate in *Hacd1*-cKO mice was assessed by the ratio of two qPCR values: *Hacd2*-FRT (recombined allele, as it is possible to amplify only in the case of recombination) and *Hacd1-lox3* (to assess the total *Hacd1*). The recombination is calculated by (*Hacd2*-FRT expression)/(*Hacd1-lox3* expression).

ANNEX 2: Primers table.

Gene name	Primer name	Sequence	Tm (°C)	Size (bp)
<i>Rpl32</i>	MRH/RPL32(s)	GCT GCT GAT GTG CAA CAA A	60	115
	MRH/RPL32(as)	GGG ATT GGT GAC TCT GAT GG		
<i>Fis1</i>	RSi/eFis1(s)	GCCTGGTTTCGAAGCAAATAC	60	116
	RSi/eFis1(as)	CACGGCCAGGTAGAAGACAT		
<i>Mfn1</i>	RSi/eMFN1(s)	TGCCCTCTTGAGAGATGACC	60	182
	RSi/eMFN1(as)	AGAGCCGCTCATTACCTTA		
<i>Mfn2</i>	Rsi/eMfn2(s)	GGGGCCTACATCCAAGAGAG	60	115
	Rsi/eMfn2(as)	CCTTGGACAGGTACCCTTTG		
<i>Opal</i>	RSHi/eOpal(s)	TCAGCAAAGCTTACATGCAGA	60	180
	RSHi/eOpal(as)	TGCTTGGACTGGCTACATTTT		
<i>Hacd2-FRT</i>	Hacd2-FRT-Fbis (s)	GTGCTAAAGGCGCATAACGATAC	54	179
	Hacd2-FRT-Rbis (as)	GCTGGGTCTATAGATATCTCGAC		
<i>Hacd1-lox3</i>	HACD1-Lox3-4F (s)	ACGAAGTTATGGTCTGAGCTCGC	52	257
	HACD1-Lox3-3R (as)	TGCTTTTTTCTCTAAGCTCCTC		
<i>D-loop</i>	LR mt-Dloop-Fw (s)	CCCAGCTACTACCATCATTCAAGT	68	16569
	LR mt-Dloop-Rw (as)	GAGAGATTTTATGGGTGTAATGCGG		
	mt-Dloop-Fw (s)	ATAGCCGTCAAGGCATGAAA	58	122
	mt-Dloop-Rw (as)	GATTGGGTTTTGCGGACTAA		
<i>Beta-2-microglobulin</i>	B2M-Fw (s)	TGGTAAAGCAAAGAGGCCTAA	58	128
	B2M-Rv (as)	AGAAGTAGCCACAGGGTTGG		

ANNEX 3: Antibodies table.

Antibody	Species	Brand	Dilution
HACD1	Rabbit	Custom (Chang lab)	1/1000
OPA1	Rabbit	Cell Signalling	1/1000
p-DRP1	Rabbit	Cell Signalling	1/1000
DRP1	Mouse	Cell Signalling	1/1000
MFN2	Rabbit	Cell Signalling	1/2000
FIS1	Rabbit	Santacruz	1/200
β -ACTIN	HRP	Santacruz	1/10000
MFF	Rabbit	Abcam	1/1000
COX IV	Mouse	Abcam	1/2000
LC3	Rabbit	Abcam	1/1000
VDAC	Rabbit	Abcam	1/2000
IP3R1	Rabbit	Abcam	1/1000
PARKIN	Rabbit	Sigma	1/1000
GAPDH	Rabbit	Santacruz	1/500
β -TUBULIN	Rabbit	Cell Signalling	1/1000
DNM2	Rabbit	Custom (Laporte lab)	1/500
TOMM20	Mouse	Abcam	1/1000
Secondary Rabbit	Donkey	Jackson Immunoresearch	1/25000
Secondary Mouse	Donkey	Jackson Immunoresearch	1/20000

ANNEX 4: Habituation program for treadmill.

	Stage duration (min)	Speed (cm/sec)	Elapsed time (min)
J1	3	0	3
	3	10	6
	3	16	9
	3	22	12
J2	3	0	3
	3	10	6
	3	16	9
	3	22	12
J3	1	0	1
	3	10	4
	3	16	7
	3	22	10
	3	28	13
J4	1	0	1
	3	10	4
	2	16	6
	2	22	8
	2	28	10
	1	33	11

ANNEX 5: Program for treadmill evaluation of maximal aerobic speed.

Speed (cm/sec)	Stage duration (min)	Elapsed time (min)
0	3	0
11,3	1	1
14,2	1	2
17,0	1	3
19,8	1	4
22,7	2	6
25,3	2	8
28,2	2	10
31,2	1'30	11'30
34,2	1'30	13
37,2	1'30	14'30
40,0	1	15'30
42,8	1	16'30
45,7	1	17'30
48,5	1	18'30
51,5	1	19'30
54,5	1	20'30
57,5	1	21'30
60,3	1	22'30
63,0	1	23'30
65,8	1	24'30
68,7	1	25'30
71,4	1	26'30
74,2	1	27'30
77,0	1	28'30
79,8	1	29'30

82,6	1	30'30
85,3	1	31'30
88,1	1	32'30
90,9	1	33'30
93,7	1	34'30
96,5	1	35'30
99,2	1	36'30
102,0	1	37'30

RESULTATS

CHAPITRE 1 : ROLE DES GENES HACD DANS LE DEVELOPPEMENT ET LA FONCTION MITOCHONDRIALE

A l'échelle moléculaire, les gènes *Hacd* sont nécessaires à la synthèse des AGTLC et influencent donc potentiellement les propriétés membranaires des organites et des cellules. A l'échelle de l'organisme, seule l'implication du gène *Hacd1* dans une myopathie chez l'être humain, le chien et la souris est décrite à ce jour (Abbasi-Moheb et al., 2020; Al Amrani et al., 2020; Blondelle et al., 2015; Muhammad et al., 2013; Pelé et al., 2005; Toscano et al., 2017). Notre équipe s'est donc intéressée à l'étude du gène *Hacd2*, exprimé précocement et ubiquitairement, ainsi qu'au gène *Hacd1*, dont l'expression de l'isoforme active est restreinte aux muscles (Blondelle et al., 2015; Wang et al., 2004). La perte de fonction de ce premier gène provoque une létalité embryonnaire ou précoce après la naissance, qui a fait l'objet au laboratoire de deux études qui vont être publiées et auxquelles j'ai participé ; elles seront présentées dans un premier temps.

Dans un second temps, je me focaliserai sur *Hacd1*, dont l'isoforme active est quasi-exclusivement musculaire. La fonction musculaire étant étroitement liée à son fonctionnement énergétique, je présenterai dans ce chapitre le travail que nous avons réalisé pour comprendre dans notre modèle le rôle du gène *Hacd1* dans le fonctionnement et la morphologie mitochondriale. Ainsi, un premier article traitant du fonctionnement énergétique chez les souris mutantes pour *Hacd1* (*Hacd1*-KO) a été publié en janvier 2021 dans *Science Advances*. Dans un second temps, les résultats concernant les autres aspects mitochondriaux, notamment autour de la dynamique mitochondriale dans le muscle, seront présentés.

PUBLICATION 1: *HACD2* DEFICIENCY LEADS TO EARLY AND LETHAL MITOCHONDRIAL DISEASE, TO BE SUBMITTED

Problématique

Hacd2 participe à l'élongation des AGTLC, et est très proche structurellement d'*Hacd1* (Ikeda et al., 2008). De plus, l'expression du gène humain est capable de sauver la perte de fonction du gène *Phs1*, l'orthologue des *Hacd* dans la levure. Cependant, aucun patient n'a été rapporté à ce jour et aucun modèle in vivo n'a permis d'aborder les fonctions de ce gène. Notre laboratoire a donc voulu établir un modèle murin afin de mieux étudier ce gène et de comprendre son fonctionnement.

Résultats

Suite à la génération de souris porteuses d'une construction possédant un rapporteur *LacZ* au locus *Hacd2* après recombinaison homologe, nous avons montré qu'*Hacd2* possède une expression assez ubiquitaire dès le stade embryonnaire puis à l'âge adulte. Deux allèles ont pu être générés grâce au vecteur de recombinaison homologe utilisé : un allèle perte de fonction (*Hacd2^{KO}*) et un allèle donnant lieu à une expression résiduelle d'*Hacd2*, dit *Hacd2^{KD}*. Le croisement d'animaux hétérozygotes pour l'allèle *Hacd2^{KO}* ne donne naissance à aucun petit *Hacd2^{KO/KO}* (dits *Hacd2*-KO). L'étude présentée a permis de déterminer que ceci était dû à une létalité embryonnaire des individus *Hacd2*-KO aux alentours du stade embryonnaire E9.5, suite à un retard de développement et des malformations cardiovasculaires (notamment la présence d'une large vésicule péricardique d'œdème). Cette observation a amené à l'étude du modèle *Hacd2*-KD, avec une expression résiduelle d'environ 5 à 20% en fonction des organes. Les individus *Hacd2*-KD survivent jusqu'à 1 à 4 semaines post-natales, avec le développement progressif d'une ichtyose, puis meurent de cachexie et léthargie associées à des défauts systémiques, notamment dans le foie et les reins. Nous avons montré grâce à de la respiration sur tissus une perte d'efficacité mitochondriale dans les embryons *Hacd2*-KO et le foie et les reins des *Hacd2*-KD, ainsi qu'une désorganisation structurale, notamment des crêtes mitochondriales.

Conclusion - discussion

Ainsi, nous avons montré qu'*Hacd2* est un gène essentiel pour le développement. Au-delà de cette observation, ceci permet d'apporter une preuve supplémentaire de l'importance des AGTLC dans la physiologie de l'organisme. De plus, la génération de la lignée *Hacd2*-KD est un outil supplémentaire dans la compréhension de l'importance de ces acides gras, dans les stades précoces suivant la naissance. Enfin, cette étude nous a offert une opportunité de mettre

au point une technique innovante de respiration sur embryon afin d'étudier la fonction mitochondriale globale à des stades précoces du développement.

Ma contribution

Dans cette étude, j'ai participé aux mesures de glucose et lactate sanguins et aux prélèvements sur les individus *Hacd2*-KD. Sur ces individus comme sur les embryons à E9.5, j'ai participé à la mise au point ainsi qu'à la réalisation des expériences de respiration sur embryons entiers ou sur tissus.

***Hacd2* deficiency leads to early and lethal mitochondrial disease**

Nahed Khadhraoui^{1,2,3}, Alexandre Prola^{1,2,3}, Aymeline Vandestienne^{1,2,3}, Jordan Blondelle^{1,2,3}, Laurent Guillaud^{1,2,3}, Guillaume Courtin^{1,2,3}, Maxime Bodak^{1,2,3}, Audrey Solgadi⁴, Hélène Huet⁵, Christine P  choux⁶, Mélody Wintrebert^{1,2,3}, Frédéric Relaix^{1,2,3}, Laurent Tiret^{1,2,3,*}, Fanny Pilot-Storck^{1,2,3,*}

¹ Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, Team Relaix, F-94010 Creteil, France.

² EnvA, IMRB, F-94700 Maisons-Alfort, France.

³ EFS, IMRB, F-94010 Creteil, France.

⁴ UMS IPSIT, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, F-92296, France.

⁵ Biop  le,   cole nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, F-94700, France

⁶ Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, GABI, F-78350, Jouy-en-Josas, France.

* Co-last and co-corresponding authors

Corresponding authors e-mail addresses: fanny.storck@vet-alfort.fr; laurent.tiret@vet-alfort.fr

Summary

Mitochondria fuel most animal cells with ATP energy and accordingly, early and broad failure of mitochondrial function leads to severe forms of mitochondrial diseases. On the contrary, later or restricted mitochondrial dysfunction may lead to mild diseases, as observed for *Hacd1*-related myopathy in humans, dogs and mice for example. As *Hacd1*, *Hacd2* gene encodes an enzyme involved in very long chain fatty acid ($C \geq 18$) synthesis, yet its roles in vivo are unknown. Here we show that *Hacd2* displays an early and broad expression and that both the knockout and knockdown of its expression in mouse are lethal. Knockout of *Hacd2* leads to embryonic lethality around E9.5, characterized by a developmental delay and severe cardiovascular malformations of the embryos. In parallel, knockdown of *Hacd2* leads to death within one to four weeks after birth, after a sudden growth arrest followed by cachexia and lethargy, without macroscopic abnormalities. In-depth mechanistic analysis revealed that both *Hacd2*-knockout embryos and vital organs of *Hacd2*-knockdown pups displayed reduced mitochondrial efficiency, in association with altered mitochondrial ultrastructure. Molecularly, we demonstrated the presence of oxidized cardiolipin in *Hacd2*-knockout embryos. Altogether, this study reveals essential roles for *Hacd2* gene in embryonic and postnatal development through the control of proper mitochondrial organization and function.

Keywords

Mitochondrion; cristae; phospholipid; fatty acid; VLCFA; ELOVL; OXPHOS coupling; lipidomics; cardiac development; angiogenesis; vasculogenesis; CD31; ATP synthase; cardiolipin oxidation; Hsd17b12

Introduction

Mitochondria are double-membrane-bound organelles that provide most cell energy supply through the oxidative phosphorylation (OXPHOS) process, which consists in an electron transfer by the respiratory chain that generates a proton gradient, which in turn allows the synthesis of ATP by the ATP synthase (Mitchell, 1961). Impairment in OXPHOS leads to mitochondrial diseases, which is one of the most common and severe groups of inherited diseases (Frazier et al., 2019; McCormick et al., 2018; Vafai and Mootha, 2012). Mutations in >250 genes of both mitochondrial and nuclear genomes have been identified as responsible for mitochondrial diseases, yet molecular diagnosis is still lacking for many patients. Mitochondrial diseases are clinically diverse, with one or several affected organs and prenatal to adult onset. Because of their high energy demand, brain, heart, muscle, liver, kidney and endocrine organs are the most frequently affected organs in mitochondrial diseases, either alone or in any possible combination, depending in part on the expression pattern and redundancy of the mutated gene (Frazier et al., 2019; Maldonado et al., 2019; Murayama et al., 2019). A large part of genes involved in mitochondrial diseases are directly involved in OXPHOS and encode in particular OXPHOS subunits or assembly factors. In parallel, many nuclear genes involved in mitochondrial diseases are indirectly required for the OXPHOS, ensuring proper mitochondrial organization. Among this group belong several genes involved in mitochondrial morphology, dynamics and membrane lipid composition. A particular feature of mitochondria stands in the complex organization of its inner mitochondrial membrane (IMM), which folding into cristae relies on an exquisite interplay between proteins and lipids (Cogliati et al., 2016; Lu and Claypool, 2015). Notably, it requires cardiolipin, a four acyl-chain phospholipid specific of the IMM, which favors correct folding of the IMM and allows efficient organization of respiratory complexes and optimal function of the ATP synthase (Ikon and Ryan, 2017; Paradies et al., 2014).

Membrane phospholipids, including cardiolipin, often comprise one or several acyl chain of 18 or more carbons (Hishikawa et al., 2014; Lu and Claypool, 2015; Renne and de Kroon, 2018). Contrarily to fatty acids <C18 that are synthesized in the cytosol by Fatty Acid Synthase complex, fatty acids from C18 are elongated by the Very Long Chain Fatty Acid (VLCFA) cycle machinery, in a four-step cycle accomplished in the ER by membrane-embedded enzymes (Sassa and Kihara, 2014). The first reaction is a condensation catalyzed by ELOVL proteins, which are encoded by seven different genes with diverse but partly redundant expression

patterns. The second and fourth reactions are reductions catalyzed by unique KAR and TER proteins, respectively. The third reaction is a dehydration catalyzed by HACD proteins, encoded by *Hacd1* to 4 genes. The essential role of the VLCFA elongation cycle is attested by the lethality of mutant yeasts for *PHS1* gene that encodes the unique yeast HACD ortholog and of mutant mice for *Hsd17b12* gene that encodes KAR protein, which die at E9.5 during embryonic development (Denic and Weissman, 2007; Rantakari et al., 2010). Because of their large array of expression patterns and their partly redundant activities, inactivation of *Elovl* genes has been associated with diverse phenotypes, yet precise cellular and molecular mechanisms are fragmentary (Sassa and Kihara, 2014). Of note, mechanistic characterization has been achieved in *HACD1* deficient conditions (Blondelle et al., 2015) (Prola et al., *accepted in Science Advances*). *HACD1* mutations cause a congenital myopathy in humans, dogs and mice that associates reduced muscle mass and weakness (Al Amrani et al., 2020; Blondelle et al., 2015; Muhammad et al., 2013; Pelé et al., 2005; Toscano et al., 2017). *Hacd1* has been proven to play a key role in membrane phospholipid composition, both in muscle development and function (Blondelle et al., 2015)(Prola et al.). In particular, *Hacd1* deficiency impairs proper mitochondrial membrane composition and structure and leads to defective respiratory coupling between the respiratory chain and the ATP synthase, thus including *HACD1*-related myopathy into the group of mitochondrial myopathies (Prola et al.).

In contrast, no mutation has been described so far for *Hacd2* gene. Structural and in vitro functional analyses revealed that HACD1 and HACD2 proteins share a close proximity (Ikeda et al., 2008) but contrarily to *Hacd1* which expression of its full-length isoform that encodes the catalytically active protein is nearly restricted to skeletal and cardiac muscle (Blondelle et al., 2015), *Hacd2* reportedly exhibits a broad expression pattern (Wang et al., 2004). We decided to investigate *Hacd2* function during mouse development. Using two different constructs, we managed to create both a knockout (KO) and a knockdown (KD) condition for *Hacd2* expression. Neither *Hacd2*-KO nor *Hacd2*-KD mice were viable, with lethality occurring at mid-embryonic development and during early postnatal life, respectively. In-depth characterization identified defective mitochondrial organization and function as a common cell failure mechanism in both conditions. Altogether, our study suggests that *Hacd2* gene is a new mitochondrial disease-related nuclear gene.

Results

Hacd2 gene is early and broadly expressed

To generate *Hacd2* deficient models in mouse, we used two independent ES cell lines (G09, A10) containing a versatile KOMP recombination construct at *Hacd2* locus. After homozygous recombination and verification of germline transmission, we generated mice bearing the following alleles: *Hacd2*-Flox (native recombined construct), *Hacd2*-KO (after excision of exon 2 by a ubiquitous Cre recombinase) and *Hacd2*-cKO (after excision of *LacZ* and *NeoR* cassettes by a ubiquitous flippase) (Figure S1).

A *LacZ* reporter gene in frame with exon 1 of *Hacd2* gene was present in *Hacd2*-Flox and *Hacd2*-KO alleles, allowing the expression of *LacZ* enzyme under the control of *Hacd2* promoter (Figure S1A-B). X-Gal staining was used to investigate the expression of *Hacd2* in *Hacd2*^{flox/+} or *Hacd2*^{KO/+} mice. Similar results were observed for individuals coming from both ES cell lines and for the two alleles. At mid-embryonic development, ubiquitous expression was observed in the embryos, with a high expression in the heart and the somites (Figure 1A-C). At E9.5, embryo sections confirmed an expression in the two layers of the heart, *i.e.* the endocardium and myocardium (Figure 1D-E). In adults, expression was observed in most organs, with a strong staining in skin (NK *et al.*, *in preparation*) and heart conductive tissue (Figure S2).

In adults also, RT-PCR experiments detected only one, full-length mRNA for *Hacd2* in all tested tissues (not shown), contrarily to *Hacd1* that displays two isoforms, a full-length one that encodes the active enzyme and a truncated isoform that encodes an inactive protein (Blondelle *et al.*, 2015). Also, in contrast with *Hacd1* gene for which expression of the full-length isoform is nearly restricted to skeletal and cardiac muscle, RT-qPCR experiments confirmed a ubiquitous expression of *Hacd2* gene, with a high expression in brown adipose tissue (BAT), white adipose tissue (WAT), liver, kidney and testis, an intermediate expression in skin, brain, stomach, lung and muscles, and a low expression in all other tested tissues (Figure 1F). At day 9 after birth (P9), a broad expression of *Hacd2* gene was already present, with the highest expression found in the liver and BAT (Figure 1G).

***Hacd2* deficiency is lethal**

To characterize the role of *Hacd2* in vivo, we first crossed heterozygous mice for the *Hacd2* knockout (KO) allele to examine the consequences of *Hacd2* complete loss-of-function. No viable *Hacd2*^{KO/KO} (hereafter *Hacd2*-KO) mice were born, whereas the other genotypes followed expected Mendelian ratios (analyzed pups n = 48, *Hacd2*^{+/+} n = 16, *Hacd2*^{+/^{KO} n = 32). We interrupted the gestation of mothers carrying *Hacd2*-KO embryos from progressively earlier stages. At embryonic day 11.5 post coitum (E11.5) and then E10.5, we observed very abnormal and delayed embryos with pericardial edema, absence of salient cephalic vesicles, pigmented optic vesicles, protruding limb buds or well-defined branchial arches (Figure 2A). In some cases, we noticed the first signs of an embryonic resorption evidenced by a truncated caudal part and a collapsed heart (Figure 2A).}

We next analyzed *Hacd2*-KO embryos at E9.5. Genotyping revealed normal Mendelian ratios at this stage (analyzed embryos n = 285, *Hacd2*^{+/+} n = 64, *Hacd2*^{+/^{KO} n = 147, *Hacd2*-KO n = 74). WT and *Hacd2*^{+/^{KO} littermates were indistinguishable, thus hereafter called “control” embryos. At E9.5, all control embryos with 18-22 pairs of somites had turned, subdivision of the primitive brain vesicles was visible in the cephalic region, characterized by closure of the anterior neuropore and well developed telencephalic vesicle. Two pairs of branchial arches were also clearly visible, as well as otic vesicles and optic pits (Figure 2A). On the contrary, all *Hacd2*-KO embryos had developmental delays evidenced by a smaller cephalic region with poorly defined subdivisions, and in many cases the anterior neuropore remained open, revealing anterior neural folds. In the posterior part, the allantois was always present. Among these globally delayed embryos, two groups could be distinguished. Most of them (81 %) had completed their turning, otic pits and branchial arches were visible (Figure 2A), but they contained a fewer pairs of somites whose number enabled to classify them as E9.0 to E9.25 embryos. Of note, most of these embryos had a nascent pericardial edema (Figure 2A), indicative of a cardiovascular dysfunction sufficient at this stage to induce a growth arrest and death of the embryo. The second group (19 %) was composed of embryos with even more pronounced stunted growth or developmental delays, evidenced by an incomplete turning. After removal of annexes, they appeared as erected embryos that were staged as E8.5 embryos (Figure 2A).}}

RT-qPCR analysis confirmed the complete lack of *Hacd2* mRNA expression in *Hacd2*-KO embryos (Figure 2B), and in western blot a band at the expected size of HADC2 protein was

present in WT embryos but absent in *Hacd2*-KO embryos (Figure 2C). Absence of transcripts and protein proved full efficiency of the genetic knockout strategy.

Secondly, we took advantage of the *Hacd2*-Flox allele to investigate the consequences of a partial reduction of *Hacd2* expression. Indeed, a strong splicing acceptor site at the 5' end of the *LacZ* construct should favor splicing between the *LacZ* cassette and exon 1 of the *Hacd2* gene. However, WT splicing between exon 1 and exon 2 of the *Hacd2* gene remains plausible (Figure S1), and in this case, residual expression of *Hacd2* mRNA was expected, at least in some organs. Mating between heterozygous mice for the *Hacd2*-Flox allele gave rise to pups of all expected genotypes, although the number of *Hacd2*^{flox/flox} (hereafter *Hacd2*-KD) pups at postnatal day 5 (P5) was slightly reduced compared to the expected Mendelian ratio (analyzed pups n = 342, *Hacd2*^{+/+} n = 100, *Hacd2*^{+/^{flox}} n = 180, *Hacd2*^{flox/flox} n = 62). We further observed that between P5 and P22, all *Hacd2*-KD pups exhibited a growth arrest systematically leading to cachexia and lethargy within a few days, which required compassionate euthanasia (Figure 2D). RT-qPCR experiments revealed reduced, albeit non-null levels of *Hacd2* mRNA in *Hacd2*-KD pups compared to their WT littermates, with the strongest reduction observed in the liver (- 91%), the kidney (- 82%), the brown adipose tissue (BAT, - 71%), the heart (- 70%) and muscle (- 39%) (Figure 2E). Residual expression of *Hacd2* mRNA in *Hacd2*-KD pups confirmed that this condition constitutes a knockdown model for the *Hacd2* gene.

***Hacd2* knockout leads to severe cardiovascular malformations**

We analyzed the *Hacd2*-KO embryos at E9.5, when development deviated from the normal course for a majority of them. Also, by this time point they are constituted of a sufficient number of cells (Palis et al., 1999) for the quantitative molecular and functional analyses that we had to carry out. Between E8.5 and E9.5, the total number of cells in the embryo and its annexes increases almost ninefold, from 112,000 to 960,000 (Palis et al., 1999). This exponential growth is accompanied by the establishment of a circulatory system that allows each cell to be rid of metabolites and supplied with substrates, growth factors, signaling molecules and oxygen in a buffered medium. Beyond stage E7.5, the survival of the embryo depends successively on the vascularization of the yolk sac - choriovitellin placentation - and then on the proper embryonic circulation. We therefore carefully observed the development of vascular networks and heart. Systematically, the yolk sac of *Hacd2*-KO embryos was devoid of the vessels that were well developed in controls (Figure 3A). In *Hacd2*-KO embryos, vessel

development was stopped at the honeycomb-shaped capillary plexus stage. No red blood cells were visible inside these vascular anlagen (Figure 3A).

Even in the most advanced E9.5 *Hacd2*-KO embryos, the heart never resembled a normally developed looped heart. In most cases, it remained at the heart tube stage (Figures 2A and 3B), a hallmark of the late E8.5 stage.

Analysis on histological sections or from high-resolution episcopic microscopy (HREM) images allowed to identify the presence of the three concentric cellular layers constituting the heart, namely the pericardium, myocardium and endocardium (Figures 3B and 3C). However, the myocardium was always thinner than in controls. Because the primitive myocardium secretes cardiac jelly (Krug et al.), we stained transverse sections with alcian blue that reveals cardiac jelly and observed that it was produced in *Hacd2*-KO embryos, although in a smaller amount than in controls (Figure 3B and 3C).

We then observed the internal vascularization of whole embryos with a binocular loupe, by HREM or by z-stack confocal imaging of the endothelial network immunolabeled with an anti-CD31 antibody. In both control and *Hacd2*-KO embryos, we observed the presence of a pair of dorsal aortae and umbilical veins, an anterior and a posterior cardinal vein and a caudal vitelline vein, all lumenized. This indicated that vasculogenesis and angiogenesis proceeded appropriately (Figures 3B and 3D). However, in the *Hacd2*-KO embryos, we observed a defect in caudal expansion of the posterior cardinal vein and intersomitic vascular ramifications, which were very poorly developed in comparison with the controls (Figure 3D). Finally, red blood cells, although present in *Hacd2*-KO embryos (Figure 3C), were accumulated in the venous network, rarely observed in dorsal aortae and never in the cardiac chamber (Figures 2A and 3B).

In summary, *Hacd2* loss of function induced a vascularization defect of the conceptus, interrupted at an earlier stage in the yolk sac than in the embryo, as well as an arrest of cardiac development at stage ~E8.5. This arrest is concomitant with the looping morphogenetic movement that normally leads to the formation of a functional four-cavity heart (Kelly, 2016). In the heart, the myocardium was present, it secreted the cardiac jelly and was animated by contraction movements revealing that myocardial cells had differentiated (Movie S1). However, these contractions were never accompanied by blood movement, likely because of a poorly developed or insufficiently contracting myocardium. As the myocardium was unable to pump blood cells, they accumulated in the venous network. It was therefore considered

that the absence of *Hacd2* function causes an embryonic congestive heart failure that induced a defect in cellular perfusion responsible for a precocious termination of the embryo's development.

Hacd2 loss of function restricted to specific cardiovascular lineages does not prevent embryos from developing

We next wondered whether the proper development of the embryonic cardiovascular system requires the cell-autonomous function of *Hacd2* in its constitutive lineages. To this end, we generated embryos lacking *Hacd2* early expression in the TEK (or TIE2)+ angioblast lineage yielding yolk sac and embryonic endothelial cells (Kisanuki et al., 2001), or in the MESP1+ mesodermal cell lineage yielding precursor cells of the heart tube and the myocardium at E9.5 (Saga et al., 1999). Selective inactivation of *Hacd2* in these lineages was obtained using the Cre recombinase genetic system under the *Tek* or the *Mesp1* gene promoter (Figure S1C). In embryos expressing the *ROSA^{mTmG}* allele (Muzumdar et al., 2007), we first validated that *Tek*-Cre was expressed in the endothelium of vessels and the endocardium at E9.5, and that at this stage, *Mesp1*-Cre was broadly expressed in all lineages of the heart (Figure S3A). We then crossed each of the two Cre lines with our mice carrying the conditional *Hacd2*-cKO allele (Figure S1C) and genotyped pups after birth. In both lines, we obtained mice of the genotype allowing the invalidation of *Hacd2* in the targeted lineages in Mendelian proportion (five *Hacd2^{ckO/ckO}*; *Tek*-Cre+ individuals and six *Hacd2^{ckO/ckO}*; *Mesp1*-Cre+ individuals). They were all viable, showed no difference with their control littermates and reached adulthood in healthy conditions. Accordingly, dissection of *Hacd2^{ckO/ckO}*; *Tek*-Cre+ embryos at E10.5 showed normal yolk sac vascularization and cardiovascular development (Figure S3B). Likewise, echocardiographic parameters recorded in *Hacd2^{ckO/ckO}*; *Mesp1*-Cre+ adult mice were normal (data not shown). Efficiency of *Hacd2* inactivation in the heart of these mice was confirmed (Figure S3C).

Consistently with the early ubiquitous embryonic expression of *Hacd2*, these results reveal that its essential role in cardiovascular development likely involves other lineages in a non-cell autonomous process.

Hacd2 knockdown leads to a systemic disease resulting in cachexia

When genotyped at P5, *Hacd2*-KD pups were indistinguishable from their WT and *Hacd2*^{+/*fllox*} littermates although their body mass was already slightly reduced (Figure 4A). However, all *Hacd2*-KD pups failed to thrive before weaning, experiencing a growth arrest at a variable point between P5 and P22. From this stage, *Hacd2*-KD pups never recovered normal body mass compared to littermates and within one to five days, exhibited cachexia and lethargy, requiring euthanasia (Figures 2D and 4B). In parallel, an ichthyosis, *i.e.* a pronounced skin dehydration, appeared within one to three days after growth arrest on the hindlimbs and the tail, which could eventually lead to tail necrosis in the most severe cases (Figure 2D; NK et al., *in preparation*). At the terminal stage, growth retardation was illustrated by a lower body mass compared to littermates (Figure 4C) and at necropsy, liver, BAT and *tibialis anterior* muscle mass was significantly reduced compared to littermates (Figure 4D). However, morphological examination of the heart and large vessels (data not shown), and routine histological examination of liver, kidney and muscle failed at identifying abnormalities (Figure S4) and blood and marrow smear tests revealed normal cell counts (data not shown).

To identify the causative mechanisms of this condition, we examined younger *Hacd2*-KD pups when still growing. Strikingly, infrared thermic camera revealed that still naked *Hacd2*-KD pups were devoid of the characteristic interscapular bright area that was observed in control littermates, which corresponded to BAT-related thermogenesis (Figure 4E). Nevertheless, their internal temperature was not different from their control littermates (Figure 4F), suggesting another heat source in this condition.

Most importantly, blood analysis revealed a hypoglycemia accompanied by a 2-fold increase in lactatemia in *Hacd2*-KD pups compared to littermates (Figure 4G-H).

This early excess of lactate in the context of a devastating systemic disorder was evocative of a primary mitochondrial disease, which often presents as a multi-organ, progressive and life-threatening disease when early expressed (Frazier et al., 2019; McCormick et al., 2018; Murayama et al., 2019). This hypothesis was compatible with the embryonic lethality around E9.5-E10.5 observed with *Hacd2* full knockout as severe impairment of OXPHOS or ATP synthase assembly leads to embryonic lethality at the same stage (Delavallée et al., 2020; Vrbacký et al., 2016).

***Hacd2* deficiency impairs mitochondrial energetic function**

To assess mitochondrial function in *Hacd2* deficient conditions, we first evaluated mitochondrial respiration rates of WT and *Hacd2*-KO single embryos at E9.5 using Seahorse device (Vrbacký et al., 2016) (Table S1). In *Hacd2*-KO embryos, both phosphorylating and non-phosphorylating respirations were significantly reduced (Figure 5A-B), with a stronger impact on the phosphorylating respiration, thus leading to a marked reduction in mitochondrial respiratory coupling (respiratory control ratio, *i.e.* phosphorylating to non-phosphorylating respiration ratio) (Figure 5C). These results indicate that the efficiency of both the respiratory chain and the coupling between the respiratory chain and the ATP synthase were affected in *Hacd2*-KO embryos. This reduced mitochondrial capability to generate ATP was associated with a preserved mitochondrial mass as illustrated by a similar activity of citrate synthase (CS) (Figure 5D) and no modification in the expression of CS gene and master coordinators of mitochondrial biogenesis (*Ppargc1a* and *Ppargc1b* genes and their target *Nrf1* gene) (Figure 5E). As expected from a reduced mitochondrial efficiency (Figure 5C), phosphorylation of the AMP kinase (AMPK) energy sensor was increased in *Hacd2*-KD embryos (Figure 5F).

Then, we evaluated the respiratory capacities of the main vital organs of *Hacd2*-KD pups when still growing, at P9. This early analysis of respiratory function revealed normal respiratory parameters in the heart and *tibialis anterior* muscle but altered respiratory function in BAT, liver and kidney (Table S2). More precisely, both phosphorylating and non-phosphorylating respiration rates were reduced in the BAT yet preserving respiratory coupling (Figure S5A-C). In line with the absence of a visible BAT-related thermogenesis (Figure 4E), this likely reflected a reduced activity of heat-generating respiration in this tissue, which might accommodate to a low heat requirement in *Hacd2*-KD pups.

On the contrary, respiration analysis revealed a marked decrease in the respiratory control ratio both in the liver and kidney of *Hacd2*-KD pups (-54 % and -46%, respectively) (Table S2, Figure 6A-C and F-H). In the liver, we wondered how mitochondria coped with this early reduction in respiratory efficiency and investigated mitochondrial parameters in *Hacd2*-KD mice when experiencing growth arrest. In this context, COX activity tended to increase (Figure 6D), as well as the expression of the *Cs* gene and genes involved in mitochondrial biogenesis such as *Ppargc1a*, *Nrf1* and *Tfam* (Figure S5D). These data suggested an adaptative response of the liver to the decreased mitochondrial coupling and accordingly, liver cells displayed an

increased glycolysis flux (Figure 6E) that likely participated to the observed hyperlactatemia (Figure 4H).

Oppositely, kidney cortex already displayed a marked reduction in COX activity in still growing mice (Figure 6I) and in *Hacd2*-KD pups experiencing growth arrest, both CS and COX activity tended to be reduced (Figure S5E), along with *Ppargc1a* gene expression (Figure S5F). In accordance with an absence of adaptative response in kidney, glycolysis flux remained unchanged (Figure S5G)

Together, our results showed that *Hacd2* deficiency impairs mitochondrial coupling efficiency, likely explaining the embryonic lethality associated with *Hacd2*-KO condition and the life-threatening systemic disease accompanied by hyperlactatemia in *Hacd2*-KD mice.

***Hacd2* deficiency impairs mitochondrial membrane organization**

Given these results and the role of *Hacd2* in lipid synthesis and the alteration of the composition and structure of mitochondrial membranes in *Hacd1*-deficient muscles, we investigated the ultrastructural organization and the lipid composition of mitochondria in *Hacd2*-deficient conditions.

First, we performed transmission electronic microscopy both in *Hacd2*-KO embryos and in the liver and kidney of *Hacd2*-KD pups. We carefully analyzed mitochondria ultrastructure in several tissues of different embryonic origins (*i.e.* the myocardium, endocardium, pericardium, branchial arch, foregut and ectoderm). In WT embryos, we noticed that while cristae density was variable even in a same cell, several cristae were visible in every mitochondria, exhibiting an elongated shape (Figure 7A,C,E,G). On the contrary, the vast majority of mitochondria in *Hacd2*-KO embryos exhibited abnormal cristae shape and organization, leading either to vesicle-like cristae or to the compartmentalization of mitochondria (Vincent et al., 2016) (Figure 7B,D,F,H). This latter anomaly was salient in the myocardium and its quantification revealed that 37% of mitochondria displayed compartmentalization in the myocardium of *Hacd2*-KO embryos, compared to 12% in WT embryos (n=3 embryos per genotype, $P<0.01$). In addition, double-membrane organelles resembling mitochondria in shape and location but void of any cristae-like structure were frequently observed in *Hacd2*-KO embryos, suggesting that these organelles could correspond to an ultimate stage of IMM disorganization. Alteration of respiratory parameters in association with a defective cristae structure was suggestive of perturbations in cardiolipin

metabolism, an IMM-specific phospholipid required for efficient OXPHOS process and proper cristae folding (Ikou and Ryan, 2017; Paradies et al., 2014) (Prola *et al.*).

We thus analyzed the content and the integrity of cardiolipin in *Hacd2*-KO embryos and we observed that beyond a preserved proportion of phospholipids (data not shown), they displayed a large amount of oxidized cardiolipin compared to WT (Figure 8A). However, cardiolipin oxidation did not trigger an antioxidative defense as the expression of *Sod2* and *Gpx1* genes that encode antioxidant enzymes was unchanged in *Hacd2*-KO embryos (Figure 8B).

[Precise quantification of phospholipids and cardiolipin in Hacd2-KO embryos and in liver and kidney of Hacd2-KD pups is pending.]

Altogether, these data suggest an early, broad and essential role of *Hacd2* in IMM composition and organization that supports its requirement for efficient mitochondrial function in ATP production.

Discussion

Our study revealed that both the knockout and the knockdown of *Hacd2* expression in mouse is lethal, at E10.5 embryonic stage and in the first postnatal weeks, respectively, which demonstrates that *Hacd2* gene acts as an essential gene. Phenotypes associated with *Hacd2* deficiency were pleiomorphic as *Hacd2*-KO embryos exhibited major cardiac malformations, a poor embryonic and extra-embryonic vascular development and a developmental delay whereas *Hacd2*-KD pups failed to thrive and systematically evolved to fatal cachexia and lethargy. Such devastating and pleiomorphic conditions are evocative of mitochondrial diseases, a hypothesis that was reinforced by the recent discovery of a key role of *Hacd1* gene in mitochondrial function in muscle (Prola *et al.*). Accordingly, we demonstrated severe mitochondrial dysfunction in *Hacd2*-KO embryos, as well as in liver and kidney of *Hacd2*-KD pups.

Mitochondrial diseases can affect one or several organs, but the most severe forms have predominantly multi-organs involvement, at early onset (Frazier *et al.*, 2019; McCormick *et al.*, 2018; Murayama *et al.*, 2019). These severe forms are frequently lethal in early postnatal life despite intensive care. Observation of abortion and still births in families affected by mitochondrial disease suggests that prenatal onset could also occur. *Hacd2* deficiency falls into this most severe group of mitochondrial diseases, in contrast with *Hacd1* deficiency that affects only muscle, at later onset, leading to a mild mitochondrial myopathy (Prola *et al.*). Difference in these phenotypes likely relies at least in part on the different expression patterns of the two genes. Indeed, *Hacd1* full-length isoform, which encodes the catalytically active protein, is nearly restricted to skeletal and cardiac muscles (Blondelle *et al.*, 2015) whereas we demonstrated that *Hacd2* exhibits only one full-length isoform in an early and broad pattern.

Hacd2-KO embryos were characterized by an abnormal cardiovascular development and a developmental delay that was lethal around E9.5. At that time, looping of the heart was accomplished but compartmentalization was not achieved and cardiac jelly, which promotes mesenchymal cushion development and heart compartmentalization (Kelly, 2016; Krug *et al.*), was barely present. Cardiac malformation was associated with pericardial oedema and an absence of blood flow despite cardiac beating. Vascular development was also failing, with thin and short peripheral vessels, and an absence of visible vessels in the yolk sac. Global

embryonic development was altered, with embryos often presenting reduced growth, incomplete turning, reduced tail part and delayed head development. This systemic phenotype could result from heart dysfunction and the associated absence of blood flow, which led us to test the hypothesis of a cardiac-autonomous requirement for *Hacd2* expression. Conditional knockout of *Hacd2* in cardiac and endothelial cells did not reproduce *Hacd2*-KO phenotype, suggesting that *Hacd2* role in cardiovascular development requires, or at least can be compensated by, other *Hacd2*-expressing structures, perhaps through the diffusion of products synthesized by the VLCFA elongation pathway.

Reciprocally, mitochondrial dysfunction was demonstrated in whole embryo homogenates and abnormal mitochondrial ultrastructure was observed in all analysed tissues, which likely reflects a broad requirement of *Hacd2* expression for mitochondrial organization and function. Thus, although cardiovascular malformations likely drive embryonic lethality, *Hacd2*-KO embryos likely suffered from a systemic mitochondrial phenotype.

A second genetic construct, with residual expression of *Hacd2* mRNA allowed us to investigate the consequences of *Hacd2* knockdown. Notably, residual expression of *Hacd2* gene was <20% in liver and kidney but higher in the BAT and the heart (around 30%) and in skeletal muscles (around 60%). Reduced body mass was most of the time the only clinical anomaly at day 5 (P5). However, all pups then experienced a growth arrest within one to three weeks after birth that was rapidly followed by cachexia and lethargy, leading to death or prompting euthanasia. In patients, early and devastating mitochondrial disorders often involve several organs, yet their precise involvement is generally poorly resolved (McCormick et al., 2018; Murayama et al., 2019). Here we demonstrated a mitochondrial dysfunction, with reduced mitochondrial coupling and thus efficiency in energy production, in liver and kidney of *Hacd2*-KD pups at early stages, associated with altered mitochondrial ultrastructure. While mitochondrial biogenesis tended to increase in the liver, it tended to decrease in kidney, possibly reflecting an earlier failure of kidney to cope with mitochondrial dysfunction. Hyperlactatemia and hypoglycaemia are key biological anomalies associated with severe mitochondrial diseases (McCormick et al., 2018; Murayama et al., 2019) and both perturbations were observed in *Hacd2*-KD pups in early stage, once more pointing to a primary mitochondrial disease and indicating that lactic acidosis was the likely cause of death of *Hacd2*-KD pups.

In contrast to liver and kidney, heart and skeletal muscle displayed normal respiratory parameters. This could either reflect a non-essential role of *Hacd2* gene in these organs at this

stage or a sufficient residual expression of *Hacd2* mRNA to ensure their normal mitochondrial function.

Strikingly, BAT displayed reduced respiratory levels that were corroborated by a reduction in BAT-generated heat when visualized by infrared camera. Although BAT uncoupling is normally a major source of heat for young pups (Diaz et al., 2014), reduced BAT function was not associated with hypothermia in *Hacd2*-KD pups. We hypothesize that the observed reduction in respiratory coupling in liver and kidney could turn them as sufficient heat suppliers to compensate or even trigger lower BAT function.

Mitochondrial dysfunction in *Hacd2*-KO embryos, as well as in the liver and kidney of *Hacd2*-KD pups affected both respiratory chain complexes and respiratory coupling. Mitochondrial dysfunction was thus more pronounced in *Hacd2*-deficient conditions than in *Hacd1*-deficient muscle fibres in which respiratory coupling was markedly reduced but respiratory complexes behaved normally. In *Hacd1*-deficient muscle fibres, cardiolipin depletion was proved as causative of the reduced coupling, linking HADC1 enzymatic activity to mitochondrial phospholipids synthesis (Prola *et al.*). Importantly, more severe cardiolipin alterations have been associated with defective respiratory complex assembly and function (Maranzana et al., 2013; Zhang et al., 2002, 2005) and *Hacd2* deficiency likely falls in this category. In particular, *Hacd2*-knockout was associated with high amounts of oxidised cardiolipin that likely contribute to the respiratory dysfunction and might trigger cell death in the most severely affected embryos (Maguire et al., 2017).

Finally, our study reveals that *Hacd2* is the second gene encoding enzymes of the VLCFA elongation cycle to be proven as essential for embryonic development, along with *Hsd17b12* gene, which knockout also leads to severe developmental defects and embryonic arrest at E9.5 (Rantakari et al., 2010). In light of our observations, analysis of mitochondrial function would be of interest in this condition.

In conclusion, we identified that *Hacd2* deficiency is responsible for a severe and early mitochondrial disease, likely demonstrating an early requirement of *Hacd2* for mitochondrial organization and function.

- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

- DETAILED METHODS
 - Generation of *Hacd2*-deficient mice
 - Extraction and PCR analysis of genomic DNA
 - Tissue and embryo collection
 - X-Gal staining of embryos
 - Extraction of total RNA, RT-PCR and RT-qPCR analyses
 - Histological staining
 - Immunofluorescence
 - High-Resolution Episcopic Microscopy (HREM) imaging
 - Determination of glucose and lactate blood concentration
 - Infrared thermography
 - Enzyme assay
 - Respiratory measurement
 - Western blot experiments
 - Electron microscopy
 - Lipidomic analyses

- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSES

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Experiments on mice were approved by the Anses/EnvA/Upec Ethics Committee (C2EA – 16; approval number 20/12/12-17 and 17-031) and all care and manipulations were performed in accordance with national and European legislation on animal experimentation. The whole study was carried on animals that were housed in stainless steel cages containing environmental enrichment, in rooms maintained at 22 ± 1 °C with an air change rate of 12 vol/h and lit from 7am to 7pm. Food and water were given *ad libitum*. Food was breeding diet for rats and mice (C1314, Altronim) for pregnant and lactating females or maintenance diet (C1324, Altronim) for weaned animals.

DETAILED METHODS

Generation of *Hacd2*-deficient mice

Three clones of recombinant ES cells with a tm1a(EUCOMM)Hmgu allele at the *Hacd2* locus (MGI:1918007; clones A10, E11 and G09) were obtained from the EUCOMM consortium (www.mousephenotype.org) and were injected into host blastocysts. Southern blot of genomic DNA confirmed a unique insertion of the recombination vector, at the *Hacd2* locus for all three clones. As chimeras derived from the E11 clone did not transmit the recombinant allele, independent *Hacd2* mutant lines were established from the two A10 and G09 clones.

Mice carrying the *Hacd2* targeting allele (*Hacd2^{fllox}*, further named *Hacd2^{KD}*) were bred with *PGK-Cre* mice to generate *Cre*-positive mice carrying a recombinant, knockout *Hacd2* (*Hacd2^{KO}*) allele lacking exon 2 and the *NeoR* cassette. In parallel, mice

carrying the *Hacd2^{fllox}* allele were bred with *act-Flp* mice to generate *Flp*-positive mice carrying a recombinant allele lacking *LacZ* and *NeoR* cassettes, suitable for conditional knockout (*Hacd2^{ckKO}* allele). Eventually, we generated an *Hacd2* allele lacking exon 2 and the *NeoR* cassette (*Hacd2^{completeKO}*) by sequentially crossing *Hacd2^{fllox}*-bearing mice with *act-Flp*-bearing mice and then with *PGK-Cre*-bearing mice. In all cases, *PGK-Cre* and *act-Flp* transgenes were eliminated at the following generation. All experiments were performed on mice generated from the two independent ES clones. We confirmed the complete similarity of *Hacd2^{KO/KO}* and *Hacd2^{completeKO/completeKO}* embryos and further performed the experiments on *Hacd2^{KO/+}* crosses.

To generate *Hacd2* conditional knockout, we crossed *Hacd2^{ckKO/+}* mice with *Mesp1-Cre*- or *Tie2-Cre*-bearing mice and mice bearing both alleles were further crossed with *Hacd2^{KO/+}* mice to obtain *Hacd2^{ckKO/KO}*; *Mesp1*- or *Tie2-Cre*+ mice and control littermates.

Extraction and PCR analysis of genomic DNA

Mouse embryos were harvested at specific developmental stages from timed pregnant females. Embryos were dissected under a stereomicroscope (Nikon SMZ1500).

For pups from *Hacd2^{KD/+}* crosses, we sectioned a finger at P5 for genotyping and identification. For embryos, we carefully removed the yolk sac, avoiding contamination with maternal tissues. Genotyping was performed on yolk sac and finger lysates. Samples were incubated 20 min at 99 °C in 50 µl or 200 µL (yolk sac and finger, respectively), of a 25 mM NaOH, 0.2Mm EDTA buffer, then the same volume of a 40 mM Tris buffer pH5 was added, followed by centrifugation 2 min at 20,000 rcf.

Primers used for genotyping for *Hacd2* alleles are shown in the Table S3. Primers used to detect the *PGK-Cre*, *Mesp1-Cre*, *Tek-Cre* or *act-FLP* transgene are shown in Table S4.

Tissue and embryo collection

Mice were killed by cervical dislocation for animals older than three weeks, or by section of the head for mice up to three weeks, in accordance with the principles of good laboratory animal practice.

After removal, the organs were rinsed with phosphate buffered saline (PBS). Direct freezing in liquid nitrogen was carried out for RNA extraction. Freezing in liquid nitrogen-cooled liquid isopentane was carried out for cryostat sectioning. For X-Gal staining or histological analyses, organs were fixed in formol (4% formaldehyde in PBS) during 30 min or several days, respectively.

According to the vaginal plug, pregnant females carrying embryos expected to be between E9.5 and E11.5 were killed by cervical dislocation. Their pregnant uterine horns were exposed by laparotomy. When visualization of vitelline and embryonic blood vessels was required, the female and its uterine horns, left attached, were placed on ice for 30 min, which allowed for the retention of red blood cells in the so-colored vessels. For other experiments, uterine horns were removed immediately. All uterine horns were placed in a Petri dish containing PBS prechilled on ice. Incision was made along the large curvature of each uterine horn, and the fetal envelopes were removed using thin forceps to access directly to the embryo surrounded by its amniotic sac. The embryos were then rinsed in PBS and directly observed or processed as required for the different experiments. All observations of the embryos were done using a Nikon SMZ1500 stereo microscope and images were acquired using NIS software (Nikon).

Precise staging was assessed by counting pairs of somites and by observing morphological features specific of each Theiler's stage and confirmed the expected stage of embryos.

X-Gal staining of embryos

For X-Gal staining, the embryos were fixed in 1% formaldehyde in PBS for 15 min (embryos at E9.5) or 20 min (embryos at E10.5 or E11.5), then rinsed in PBS and immersed overnight at 33 °C in the absence of light, in a solution of X-Gal (4 mM potassium ferrocyanide, 4 mM potassium ferricyanide, 2 mM MgCl₂, 1% *sodium deoxycholate*, 1% Nonidet P40, 4% 5-Bromo-4-chloro-3-india-BD-Galactopyranoside or X-Gal, in PBS). The next day, the embryos were rinsed in PBS and observed.

After freezing in OCT embedding medium (Tissue-Tek) with isopentane and storage at -80°C, E9.5 embryos and adult heart from *Hacd2^{+/-KO}* mice were cut with a cryostat with a thickness of 10 µm for embryos and 20 µm for heart and sections were deposited on Superfrost slides. After taking out of the freezer at -80°C, the slides were dried and fixed as previously described and then immersed overnight at 33 °C in the absence of light, in a solution of X-Gal. The next day, slides were rinsed in PBS and mounted using aqueous mounting medium (Dako Faramount).

Extraction of total RNA, RT-PCR and RT-qPCR analyses

Samples were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Total RNAs were isolated using either TRIzol reagent (Sigma) for tissues or RNeasy plus micro kit (Qiagen) for embryos according to the manufacturer's protocol. Purity of RNAs was assessed by a ratio of absorbance at 260 nm and 230 nm > 1.8. RNA quality was checked on agarose gel. 200 ng of RNA were used for reverse transcription with the

Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas). cDNA was amplified using the Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X; Fermentas). qPCR reactions were performed on a Roche Light Cycler system (Roche). qPCR products were examined qualitatively on agarose gels. All the primers used are listed in Table S4.

Histological staining

Organs fixed with formol were processed at the EnvA Biopole. After inclusion in paraffin and cutting, sections were stained with hematoxylin and eosin.

Embryos were fixed in formol for 20 min, then embedded in paraffin and cut, and sections were stained with acidic alcian blue.

For enzymatic activities, liver and kidney were frozen in OCT embedding medium (Tissue-Tek) in isopentane precooled in liquid nitrogen, and then stored at -80°C . Sections were fixed for 30 min in formol and stained for COX activity in a 20 mM KH_2PO_4 , 80 mM Na_2HPO_4 , 30 μM 3,3'-diaminobenzidine, 1 μM Cytochrome C buffer. Images were captured using an Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) and analyzed in a blinded manner using the ImageJ software (v1.47, NIH).

Immunofluorescence

Embryos were fixed in 1% formaldehyde in PBS for 1 hour, rinsed twice in PBS for 30 min and then blocked and permeabilized with 3% BSA and 0.1% Triton X-100 in PBS for 7h at 4°C , followed by incubation with primary antibody at 4°C overnight. The following antibodies were used: Alpha-Smooth Muscle Actin (Biosciences, 50-9760-82; 1:500 dilution), CD31 (PECAM1; BD, 553370; 1:500 dilution). Embryos were then rinsed three times with 3 % BSA and 0.1% Tween in PBS and incubated for 1 h at

room temperature with a fluorophore conjugated anti-mouse or anti-rat antibody Alexa-fluor555 (A-21434) and Alexa-fluor647 (A-21247), respectively (Thermofisher; 1:500 dilution). Embryos were finally rinsed twice in PBS for 30 min. Images were acquired on a confocal microscope (Zeiss LSM 800).

HREM imaging

High Resolution Episcopic Microscopy was performed on E9.5 embryos as described (Mohun and Weninger), using the optical high-resolution microscope (indigo Scientific). Resulting datasets comprised 700 -1200 images of 1 * 1 μm size produced by repeated removal of 1-2 μm sections.

Determination of glucose and lactate blood concentration

Two small blood drops were obtained after a 0.5 mm section of tail tip. Blood glucose and lactate levels were measured using Contour XT glucometer (Bayer) and Lactate Scout (EKF Diagnostics for life) devices, respectively.

Temperature measurement

Infrared thermography was performed with the infrared digital thermographic camera E60: Compact Infrared Thermal Imaging Camera (FLIR) and data were analyzed by FLIR Quick Report software (FLIR ResearchIR Max 3.4; FLIR).

Internal temperature was obtained with a rectal probe adapted for pups (Bio-Thermo-Cis thermometer equipped with a Bio-Bret-3 rectal probe for mice; Bioseb).

Enzymatic assays

Cell extracts from small pieces of frozen tissues or embryos were obtained in an ice-

cold buffer (one ml for 20 mg of tissue or a pool of two embryos) containing 5 mM Hepes, pH 8.7, 1 mM EGTA, 1 mM DTT and 0.1% Triton X-100, using a Precellys homogenizer (Bertin), by 2 cycles of 8 s at 6,500 rpm. Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce). Total activity of cytochrome oxidase (COX) and citrate synthase (CS) was assayed at 30 °C, pH 7.5, using standard spectrophotometric assays (Caffin et al., 2013).

Respiration measurement

Fresh mouse embryos or tissues were homogenized in the assay medium (70 mM sucrose, 220 mM mannitol, 10 mM KH₂PO₄, 5 mM MgCl₂, 2 mM HEPES, 1 mM EGTA, 0.2% BSA; pH 7.2) containing substrates for Complex I (10 mM pyruvate, 2 mM malate, 10 mM glutamate) and 2 mM ADP. Homogenization was performed in a Dounce homogenizer (Sigma). Homogenates were transferred to XF-V7 24-well plates (Seahorse Bioscience) and spun down for 20 min at 2000 *g*, 4°C. The oxygen consumption rate (OCR) was determined at 37°C with complex I substrates and ADP and then after subsequent addition of 10 mM succinate, 2 μM oligomycin, 4 μM FCCP and 0.4 μM antimycin A. At the end of the run, cells from the wells were collected by up and down pipetting, transferred into tubes, and centrifuged to discard the supernatant. Two successive washes of the pellet were done with PBS, then protein quantification was performed using the bicinchoninic acid assay (Pierce BCA Protein Assay Kit -23225).

Extracellular acidification rate

Fresh tissues were homogenized in the assay medium (120 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 0.4 mM KH₂PO₄, 1.3 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM HEPES, pH 7.4) containing 15

mM D-Glucose. Homogenization was performed in a Dounce homogenizer (Sigma). Homogenates were transferred to XF-V7 24-well plates (Seahorse Bioscience) and spun down for 20 min at 2000 *g*, 4°C. The extracellular acidification rate (ECAR) was determined at 37°C after the addition of 2 µM oligomycin. At the end of the run, cells from the wells were collected by up and down pipetting, transferred into tubes, and centrifuged to discard the supernatant. Two successive washes of the pellet were done with PBS, then protein quantification was performed using the bicinchoninic acid assay (Pierce BCA Protein Assay Kit -23225).

Western blot experiments

Frozen tissues were lysed in RIPA lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% Triton, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, 0.5% deoxycholic acid), supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Pierce), using a Precellys homogenizer (Bertin). Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay. Protein extracts from embryos were loaded on Bolt™ 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen), separated for 22 min at 200 V and subsequently transferred to PVDF membranes using transfer stack and iblot2 system for 7 min at 20 V (Invitrogen). Thereafter, blots were blocked for 60 min in 5% BSA and 0.1% Tween20 in TBS pH 7.4 (20 mM Tris, 150 mM NaCl) at room temperature, followed by incubation with primary antibodies (anti-phospho-AMPK (ref. 2535) and anti-AMPK (ref. 2532) from Cell signaling; anti-HACD2 (orb33286) from Biorbyt; 1:1000) overnight at 4 °C. After washing, membranes were incubated with an HRP-conjugated anti-rabbit antibody for 60 min at room temperature and revealed using the West Femto chemiluminescent substrate (Pierce). Light emission was recorded using a chemiluminescent detection system (G-Box, Syngene) and quantified by ImageJ software (v1.47, NIH).

Transmission electron microscopy

Tibialis anterior muscle, kidney, a small piece of liver, and the apical part of heart, or embryos, were fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2, at 4°C overnight. Samples were contrasted with Oolong Tea Extract 0.5% in cacodylate buffer; postfixed with a solution of 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium cyanoferrate; gradually dehydrated in ethanol (30% to 100%) and substituted gradually in a mix of propylene oxide-epon and embedded in Epon (Delta microscopy). Thin sections (70 nm) were collected onto 200 mesh copper grids, and counterstained with lead citrate. Grids were examined with a Hitachi HT7700 electron microscope operating at 80 kV (Elexience). Images were acquired with a charge-coupled device camera (AMT).

Lipidomic analyses

Embryos, liver and kidney were collected and immediately frozen in liquid nitrogen and protected from oxidation by a layer of argon gas and stored at -80 °C until analysis. Total phospholipid amount was determined with Corona CAD detection by calculating the concentration of each PL class (in µg/ml) compared to calibration ranges of commercial standards. Chromatographic system from ThermoFisher Scientific included a Dionex U-3000 RSLC system with 2 quaternary pumps, an autosampler and a column oven. The RSLC system was coupled on-line to a charged aerosol detector, Corona-CAD Ultra for the quantitative part of the study and a LTQ-Orbitrap Velos Pro for the lipidomic study (all from ThermoFisher). Liquid chromatography, mass spectrometry, phospholipid species identification and phospholipid species representation were performed as previously described (Moulin et al., 2015).

Acetylcholinesterase activity

Heart sections from *Hacd2^{+/-KO}* mice were prepared as for X-Gal staining. Histochemical localization of acetylcholine esterase (AChE) activity in the conduction system was performed with the esterase reaction (Karnowsky and Roots reaction). Briefly, we prepare a solution containing 0.173 mM of acetylthiocholine iodide, 0.01 mM of *tetraisopropyl pyrophosphoramidate* (iso-MPA), 60 mM of sodium acetate, 5 mM sodium citrate, 3 mM cupric sulfate and 5 mM of potassium ferricyanide in PBS. Three hundred microliters of this solution were put on sections for 30 minutes and then rinsed with PBS.

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSES

All data are presented as mean \pm s.e.m.. Datasets were analysed using GraphPad Prism. Differences were evaluated using a two-tailed unpaired non-parametric Mann-Whitney test with 95% confidence. Differences between groups were considered significant if the *P* value was less than 0.05, with *: *P* < 0.05; **: *P* < 0.01; ***: *P* < 0.001 versus WT.

References

- Al Amrani, F., Gorodetsky, C., Hazrati, L.-N., Amburgey, K., Gonorazky, H.D., and Dowling, J.J. (2020). Biallelic LINE insertion mutation in HADC1 causing congenital myopathy. *Neurol Genet* 6, e423.
- Blondelle, J., Ohno, Y., Gache, V., Guyot, S., Storck, S., Blanchard-Gutton, N., Barthélémy, I., Walmsley, G., Rahier, A., Gadin, S., et al. (2015). HADC1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *J Mol Cell Biol* 7, 429–440.
- Caffin, F., Prola, A., Piquereau, J., Novotova, M., David, D., Garnier, A., Fortin, D., Alavi, M., Veksler, V., Ventura-Clapier, R., et al. (2013). Altered skeletal muscle mitochondrial biogenesis but improved endurance capacity in trained OPA1-deficient mice. *J Physiol* 591, 6017–6037.
- Cogliati, S., Enriquez, J.A., and Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem. Sci.* 41, 261–273.
- Delavallée, L., Mathiah, N., Cabon, L., Mazeraud, A., Brunelle-Navas, M.-N., Lerner, L.K., Tannoury, M., Prola, A., Moreno-Loshuertos, R., Baritaud, M., et al. (2020). Mitochondrial AIF loss causes metabolic reprogramming, caspase-independent cell death blockade, embryonic lethality, and perinatal hydrocephalus. *Molecular Metabolism* 40, 101027.
- Denic, V., and Weissman, J.S. (2007). A Molecular Caliper Mechanism for Determining Very Long-Chain Fatty Acid Length. *Cell* 130, 663–677.
- Diaz, M.B., Herzig, S., and Vegiopoulos, A. (2014). Thermogenic adipocytes: From cells to physiology and medicine. *Metabolism* 63, 1238–1249.
- Frazier, A.E., Thorburn, D.R., and Compton, A.G. (2019). Mitochondrial energy generation disorders: genes, mechanisms, and clues to pathology. *J. Biol. Chem.* 294, 5386–5395.
- Hishikawa, D., Hashidate, T., Shimizu, T., and Shindou, H. (2014). Diversity and function of membrane glycerophospholipids generated by the remodeling pathway in mammalian cells. *J. Lipid Res.* 55, 799–807.
- Ikeda, M., Kanao, Y., Yamanaka, M., Sakuraba, H., Mizutani, Y., Igarashi, Y., and Kihara, A. (2008). Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very

long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Letters* 582, 2435–2440.

Ikon, N., and Ryan, R.O. (2017). Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859, 1156–1163.

Kelly, R.G. (2016). Cardiac development and animal models of congenital heart defects. In *Congenital Heart Diseases : The Broken Heart : Clinical Features, Human Genetics and Molecular Pathways.*, (Springer-Verlag), pp. 3–9.

Kisanuki, Y.Y., Hammer, R.E., Miyazaki, J., Williams, S.C., Richardson, J.A., and Yanagisawa, M. (2001). Tie2-Cre transgenic mice: a new model for endothelial cell-lineage analysis in vivo. *Dev. Biol.* 230, 230–242.

Krug, E.L., Runyan, R.B., and Markwald, R.R. Protein extracts from early embryonic hearts initiate cardiac endothelial cytodifferentiation - ScienceDirect.

Lu, Y.-W., and Claypool, S.M. (2015). Disorders of phospholipid metabolism: an emerging class of mitochondrial disease due to defects in nuclear genes. *Front Genet* 6, 3.

Maguire, J.J., Tyurina, Y.Y., Mohammadyani, D., Kapralov, A.A., Anthonymuthu, T.S., Qu, F., Amoscato, A.A., Sparvero, L.J., Tyurin, V.A., Planas-Iglesias, J., et al. (2017). Known unknowns of cardiolipin signaling: The best is yet to come. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1862, 8–24.

Maldonado, E.M., Taha, F., Rahman, J., and Rahman, S. (2019). Systems Biology Approaches Toward Understanding Primary Mitochondrial Diseases. *Front Genet* 10, 19.

Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A.I., Lenaz, G., and Genova, M.L. (2013). Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I. *Antioxid. Redox Signal.* 19, 1469–1480.

McCormick, E.M., Zolkipli-Cunningham, Z., and Falk, M.J. (2018). Mitochondrial disease genetics update: recent insights into the molecular diagnosis and expanding phenotype of primary mitochondrial disease. *Curr. Opin. Pediatr.* 30, 714–724.

Mitchell, P. (1961). Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-

osmotic type of mechanism. *Nature* 191, 144–148.

Mohun, T.J., and Weninger, W.J. Embedding Embryos for High-Resolution Episcopic Microscopy (HREM).

Moulin, M., Solgadi, A., Veksler, V., Garnier, A., Ventura-Clapier, R., and Chaminade, P. (2015). Sex-specific cardiac cardiolipin remodelling after doxorubicin treatment. *Biol Sex Differ* 6, 20.

Muhammad, E., Reish, O., Ohno, Y., Scheetz, T., Deluca, A., Searby, C., Regev, M., Benyamini, L., Fellig, Y., Kihara, A., et al. (2013). Congenital myopathy is caused by mutation of HACD1. *Hum. Mol. Genet.* 22, 5229–5236.

Murayama, K., Shimura, M., Liu, Z., Okazaki, Y., and Ohtake, A. (2019). Recent topics: the diagnosis, molecular genesis, and treatment of mitochondrial diseases. *Journal of Human Genetics* 64, 113–125.

Muzumdar, M.D., Tasic, B., Miyamichi, K., Li, L., and Luo, L. (2007). A global double-fluorescent Cre reporter mouse. *Genesis* 45, 593–605.

Palis, J., Robertson, S., Kennedy, M., Wall, C., and Keller, G. (1999). Development of erythroid and myeloid progenitors in the yolk sac and embryo proper of the mouse. *Development* 126, 5073–5084.

Paradies, G., Paradies, V., De Benedictis, V., Ruggiero, F.M., and Petrosillo, G. (2014). Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837, 408–417.

Pelé, M., Tiret, L., Kessler, J.-L., Blot, S., and Panthier, J.-J. (2005). SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1417–1427.

Prola, A., Blondelle, J., Vandestienne, A., Piquereau, J., Denis, R.G., Guyot, S., Chauvin, H., Mourier, A., Maurer, M., Henry, C., Khadhraoui, N., Gallerne, C., Molinié, T., Courtin, G., Guillaud, L., Gressette, M., Solgadi, A., Dumont, F., Castel, J., Ternacle, J., Demarquoy, J., Malgoyre, A., Koulmann, N., Derumeaux, G., Giraud, M.-F., Joubert, F., Veksler, V., Luquet, S., Relaix, F., Tiret, L., Pilot-Storck, F. Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and

energetic efficiency in muscle (*Accepted in Science Advances*, 11/01/2020)

Rantakari, P., Lagerbohm, H., Kaimainen, M., Suomela, J.-P., Strauss, L., Sainio, K., Pakarinen, P., and Poutanen, M. (2010). Hydroxysteroid (17 β) dehydrogenase 12 is essential for mouse organogenesis and embryonic survival. *Endocrinology* 151, 1893–1901.

Renne, M.F., and de Kroon, A.I.P.M. (2018). The role of phospholipid molecular species in determining the physical properties of yeast membranes. *FEBS Lett.* 592, 1330–1345.

Saga, Y., Miyagawa-Tomita, S., Takagi, A., Kitajima, S., Miyazaki, J. i, and Inoue, T. (1999). MesP1 is expressed in the heart precursor cells and required for the formation of a single heart tube. *Development* 126, 3437–3447.

Sassa, T., and Kihara, A. (2014). Metabolism of very long-chain Fatty acids: genes and pathophysiology. *Biomol Ther (Seoul)* 22, 83–92.

Toscano, A., Emmanuele, V., Savarese, M., Musumeci, O., Torella, A., Conca, E., Moggio, M., Nigro, V., and Rodolico, C. (2017). Pseudo-dominant inheritance of a novel homozygous HACD1 mutation associated with congenital myopathy: The first caucasian family. *Neuromuscular Disorders* 27, S173.

Vafai, S.B., and Mootha, V.K. (2012). Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* 491, 374–383.

Vincent, A.E., Ng, Y.S., White, K., Davey, T., Mannella, C., Falkous, G., Feeney, C., Schaefer, A.M., McFarland, R., Gorman, G.S., et al. (2016). The Spectrum of Mitochondrial Ultrastructural Defects in Mitochondrial Myopathy. *Scientific Reports* 6, 30610.

Vrbacký, M., Kovalčíková, J., Chawengsaksophak, K., Beck, I.M., Mráček, T., Nůsková, H., Sedmera, D., Papoušek, F., Kolář, F., Sobol, M., et al. (2016). Knockout of Tmem70 alters biogenesis of ATP synthase and leads to embryonal lethality in mice. *Hum Mol Genet* 25, 4674–4685.

Wang, B., Pelletier, J., Massaad, M.J., Herscovics, A., and Shore, G.C. (2004). The yeast split-ubiquitin membrane protein two-hybrid screen identifies BAP31 as a regulator of the turnover of endoplasmic reticulum-associated protein tyrosine phosphatase-like B. *Mol. Cell. Biol.* 24,

2767–2778.

Zhang, M., Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2002). Gluing the respiratory chain together. Cardiolipin is required for supercomplex formation in the inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 277, 43553–43556.

Zhang, M., Mileykovskaya, E., and Dowhan, W. (2005). Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* 280, 29403–29408.

Acknowledgements

The authors are grateful to Camille Laisne and Diana Gelperowic for taking care of mice; the Knock-Out Mouse Program (the “KOMP”) for initially providing the ES cell lines carrying the knockout allele of *Hacd2*; F. Langa-Vives (CIGM, Institut Pasteur) for the generation of *Hacd2*-knockout mice; Jean-Paul Pais de Barros and the LAP platform (Dijon, France) for lipidomic analyses; Martine Letheule for electron microscopy (Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods MIMA2 platform, INRAE, Jouy-en-Josas, France); imaging platform from the Imagine Institute (Paris) for HREM analysis; Sigolène Meilhac and Lucile Miquerol for insightful discussions and mouse lines; Stéphane Zaffran and Marianne Gervais-Taurel for sharing reagents; Caroline Choquet, Christopher De Bono, Isabelle Lagrange, Sophie Chateau, Jean-Luc Servely, Edouard Reyes-Gomez, Pierre Deshuilliers, Nicolas Blanchard-Gutton and Julie Da Silva for technical help in histological and biochemical analyses; Geneviève Derumeaux for performing echocardiographic analysis; Roberto Motterlini, Roberta Foresti and Santos Susin (Cordeliers Institute) for providing access to Seahorse apparatus; Luisa Dandolo for providing access to the radioactivity platform of the Cochin Institute (Paris); Caroline Gilbert for sharing the infrared camera.

N.K.’s PhD fellowship has been financially supported by the French “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM). The work was primarily supported by the French “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-12-JSV1-0005) and the “Association Française contre les Myopathies” (AFM 16143 and Translamuscle). The authors declare that they have no conflict of interest.

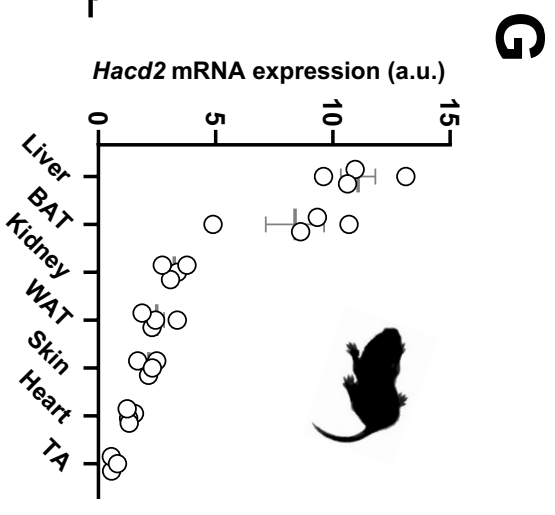
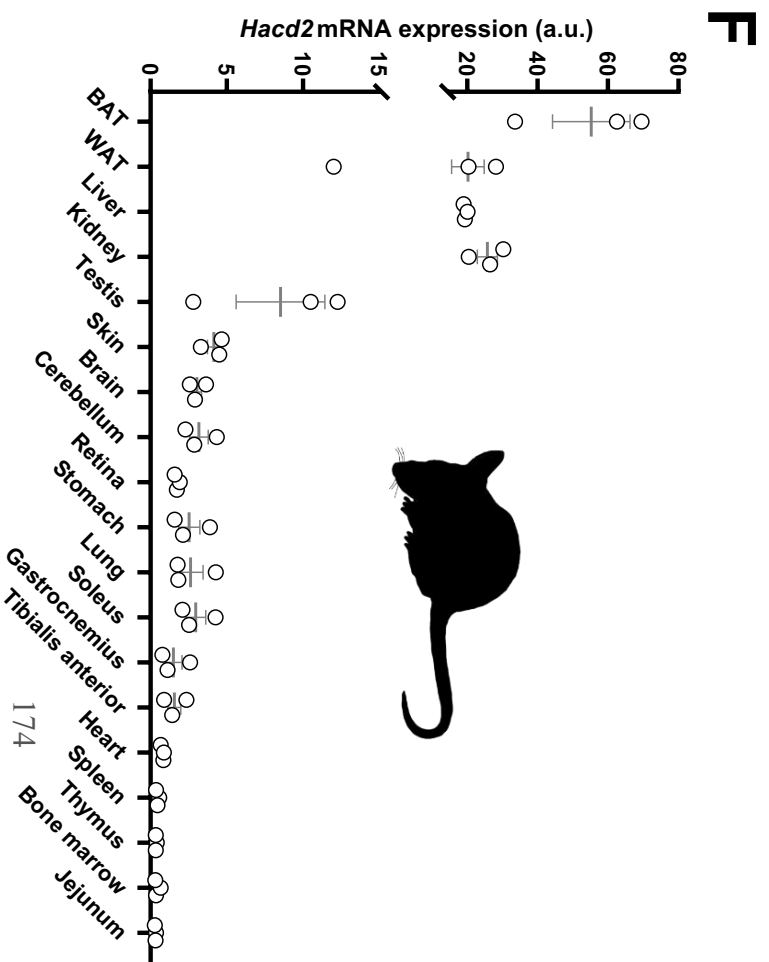
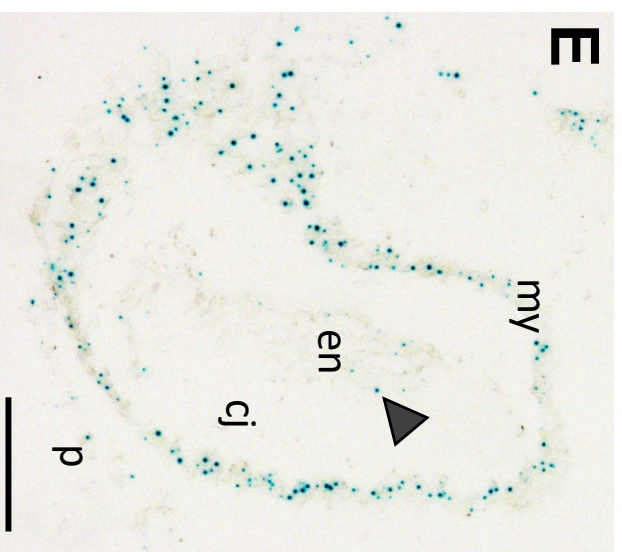
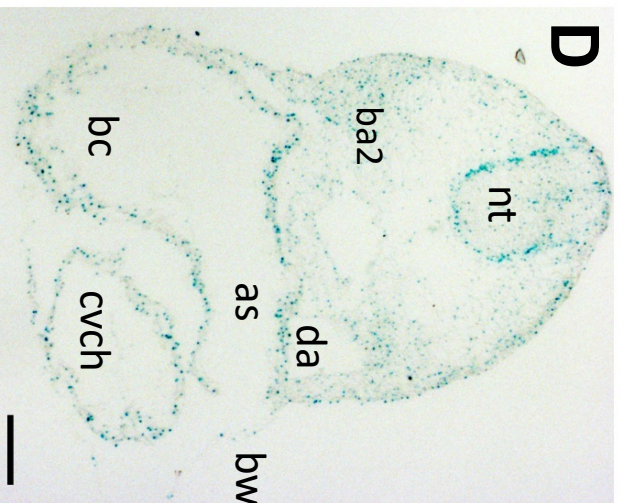
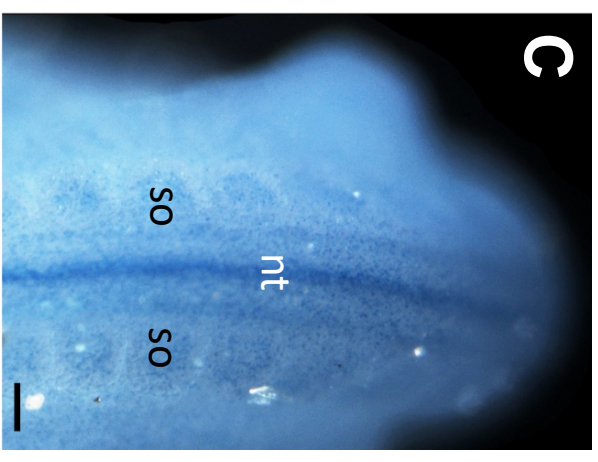
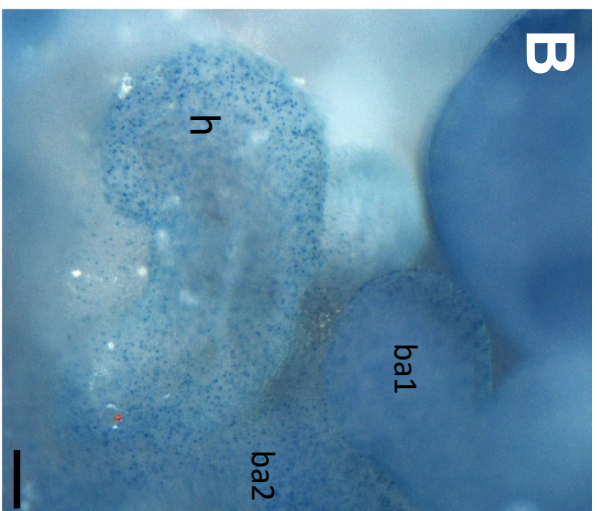
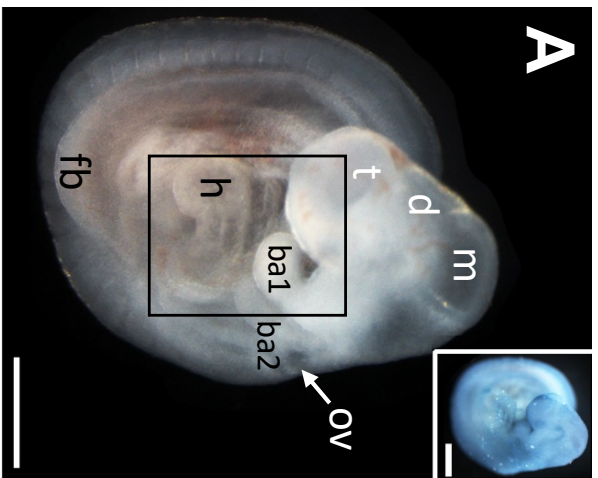


Figure 1

Figure 1 | *Hacd2* expression during embryonic development and adulthood.

(A-E) Expression pattern of *LacZ*-expressing cells on whole-mount **(A-C)** and transverse sections **(D,E)** of E9.5 *Hacd2*^{KO/+} embryos. **(A)** At this stage, embryos have 20-22 pairs of somites, they have turned, and two pharyngeal bars and the forelimb are clearly visible. After X-Gal staining, the embryo is uniformly blue (inset), reflecting ubiquitous expression of *Hacd2*. **(B)** Focus on the region outlined in (A), showing *Hacd2* expression in the embryonic heart and branchial arches. **(C)** Dorsal view of the embryo showing *Hacd2* expression in the neural tube and somites. **(D)** All cell layers of the embryo express *Hacd2*, here on a transverse section at the level of the heart. **(E)** In the heart, staining is clearly visible in the pericardium, myocardium and endocardium (arrowhead). **(F)** RT-qPCR quantification of *Hacd2* mRNA in adult WT mice, normalized to *Actin* mRNA. **(G)** RT-qPCR quantification of *Hacd2* mRNA in WT pups at postnatal day nine (P9), normalized to *Rpl32* mRNA. as is aortic sac; ba1, first branchial arch; ba2, second branchial arch; bc, *bulbus cordis*; bw, body wall, consisting in this region of pericardium and surface ectoderm; cj, cardiac jelly; cvch, common ventricular chamber of the heart; d, diencephalon; da, dorsal aorta; en, endocardium; h, heart; m, mesencephalon; my, myocardium; nt, neural tube; ov, otic vesicle; p, pericardium; so, somite and t, telencephalon. Scale bars are 500 μ m in A and 100 μ m in B-E. Individual data are plotted, along with the mean and standard error of the mean.

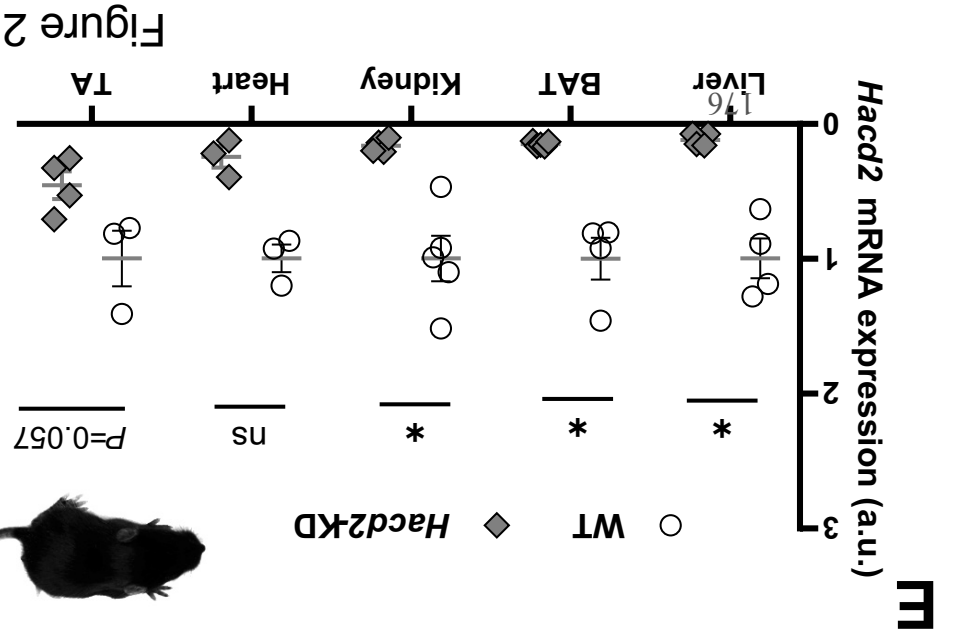
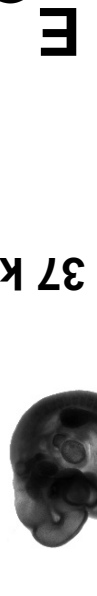
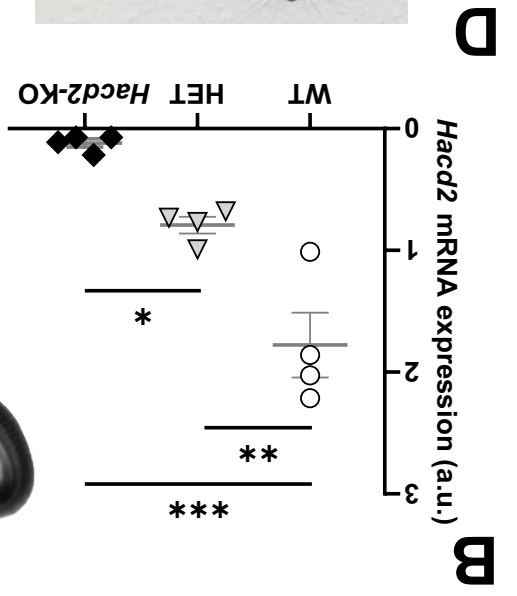
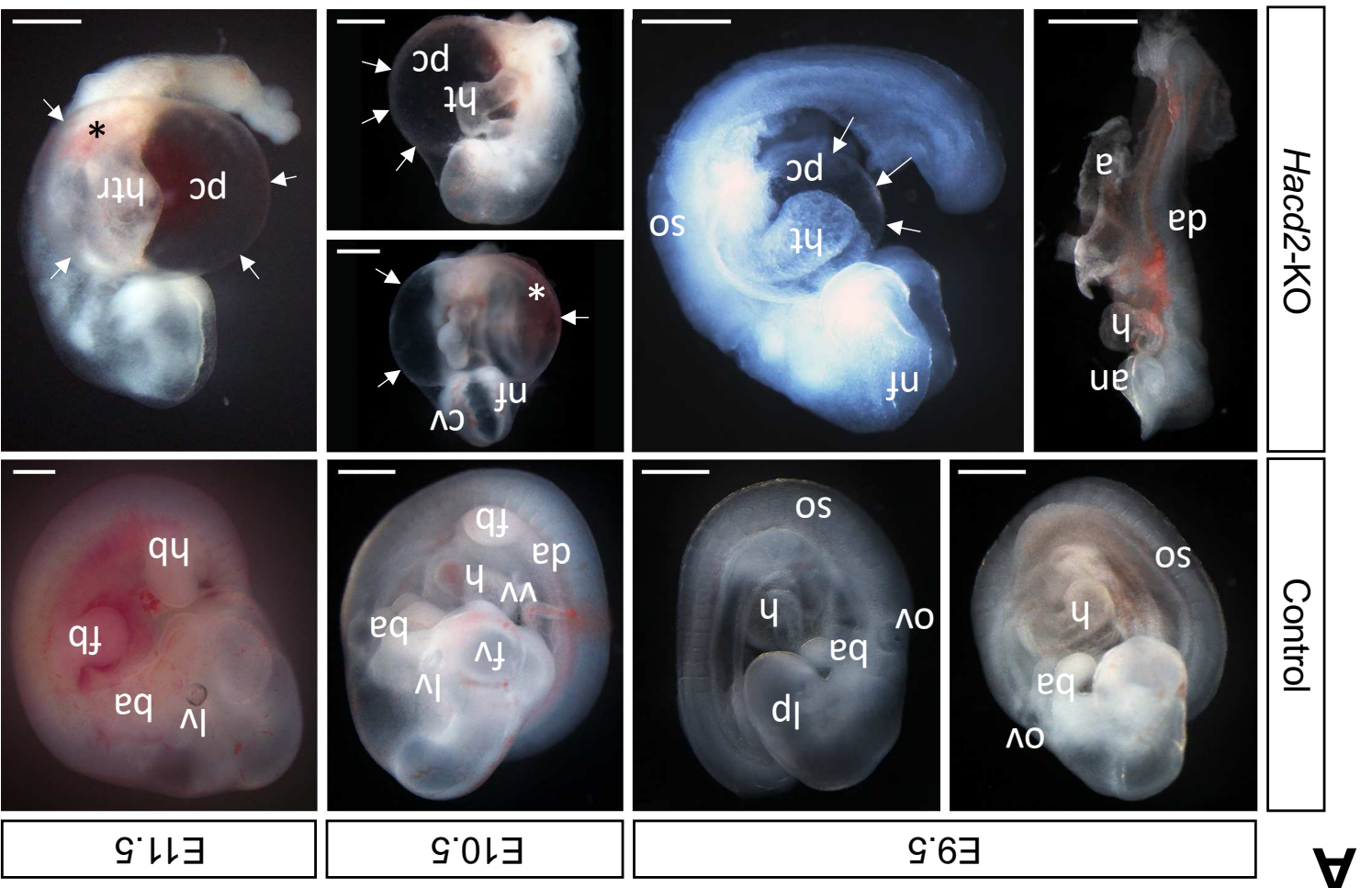


Figure 2

Figure 2 | Embryonic and postnatal lethality associated with *Hacd2* deficiency.

(A) Representative control and knockout (*Hacd2*-KO) embryos from E9.5 to E11.5. Note the reduced size of *Hacd2*-KO embryos, some of them exhibit a poorly defined tail and rudimentary head parts, with anterior and posterior neuropores still open. Most *Hacd2*-KO embryos display a pericardial edema (delimited by white arrows). Erythrocytes are visible in dorsal aorta, but they are seldom seen in head vessels and very often found sedimenting in the pericardial cavity (asterisk). In the most advanced embryos, the beating heart is not compartmentalized, in a U-shaped tubular form that contains no erythrocytes. **(B)** RT-qPCR quantification of *Hacd2* mRNA in WT, *Hacd2*^{+/*KO*} (HET) and *Hacd2*-KO embryos at E9.5, normalized to the expression of *Rpl32* mRNA. **(C)** Western blot for HACD2 protein (expected size is 37 kDa) in four WT and four *Hacd2*-KO embryos at E9.5. **(D)** Representative picture of WT (left) and *Hacd2*^{flox/flox} (*Hacd2*-KD) littermates at postnatal day 22 (P22). **(E)** RT-qPCR quantification of *Hacd2* mRNA in tissues from WT and *Hacd2*-KD pups at P14, normalized to *Rpl32* mRNA. In (A), a is amnion; an, anterior neuropore; ba, branchial arch; cv, cephalic vessel; da, dorsal aorta; fb, forelimb bud; fv, forebrain vesicle; h, heart; hb, hindlimb bud; ht, heart tube; htr, heart tube remnant; lp, lens placode; lv, lens vesicle; nf, neural folds; ov, otic vesicle; pc, pericardial cavity; so, somites and vv, vitelline vein. In (E), BAT, brown adipose tissue; TA, *tibialis anterior* muscle. Scale bars are 500 μ m in A. Individual data are plotted, along with the mean and standard error of the mean. *, $P < 0.05$.

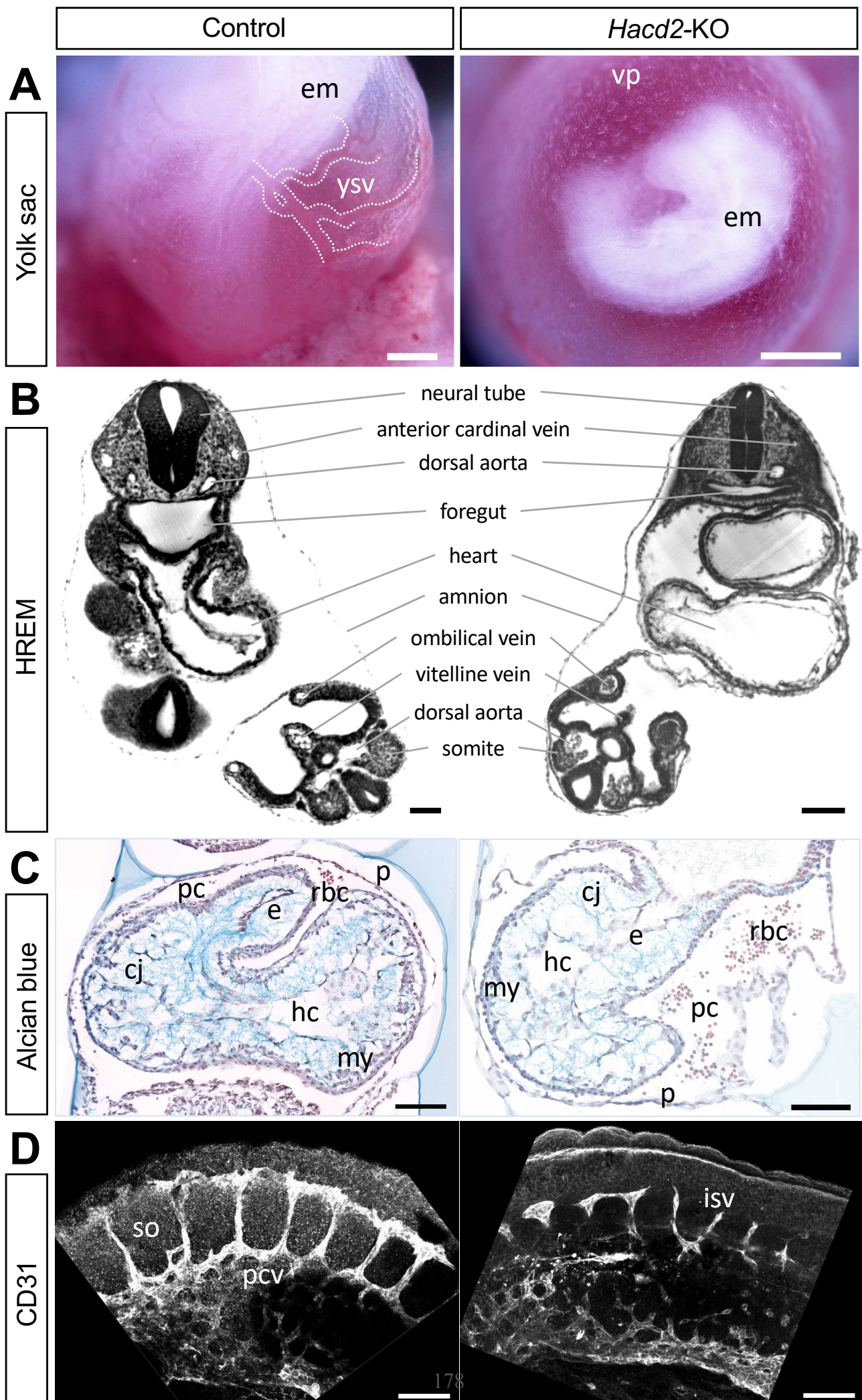


Figure 3

Figure 3 | Anomalies of cardiovascular development in E9.5 *Hacd2*-KO embryos.

(A) Representative pictures of the yolk sac surrounding the embryo (em). At this stage, yolk vascularization in the control is composed of vessels filled with red blood cells (ysv). These vessels form a tree-like network (part of which has been outlined by dotted lines) distributed over the entire surface of the sphere. In *Hacd2*-KO embryos, the early stage of a capillary plexus, formed of unconnected cell islands, is identifiable and no red blood cells are visible. **(B)** Cross-section allowing the visualization of the heart of embryos that have completed their turning, observed in high-resolution episcopic microscopy (HREM). In the *Hacd2*-KO embryo, the two cardiac cavities correspond to a stage of U-shaped heart tube arranged on the rostro-caudal axis. They are bordered by a myocardium of reduced thickness. The general organization of the embryo is similar to that of the control and all the anatomical structures are visible. In particular, all vessels are present, in the right place and lumenized. The diameter of the umbilical veins, filled with red blood cells, is increased while the diameter of the dorsal aorta is reduced. **(C)** Transverse histological cross-section stained with alcian blue, which reveals the presence in the *Hacd2*-KO embryo of cardiac jelly, present between the endocardium and the myocardium, which is less thick. The heart is not compartmentalized and barely returned. **(D)** Z-stack in confocal microscopy of blood vessels revealed by labelling of endothelial cells with an anti-CD31 antibody. Vascular projections between somites are poorly visible in *Hacd2*-KO embryo, whereas they are regular and interconnected in the control. cj is cardiac jelly ; e, endocardium ; em, embryo ; hc, heart chamber ; isv, intersomitic vessel; my, myocardium; p, pericardium ; pc, pericardial cavity ; pcv, posterior cardinal vein; rbc, red blood cells ; so, somite; vp, vascular plexus and ysv, yolk sac vessel. Scale bars are 500 nm (A) et 100 nm (B-D).

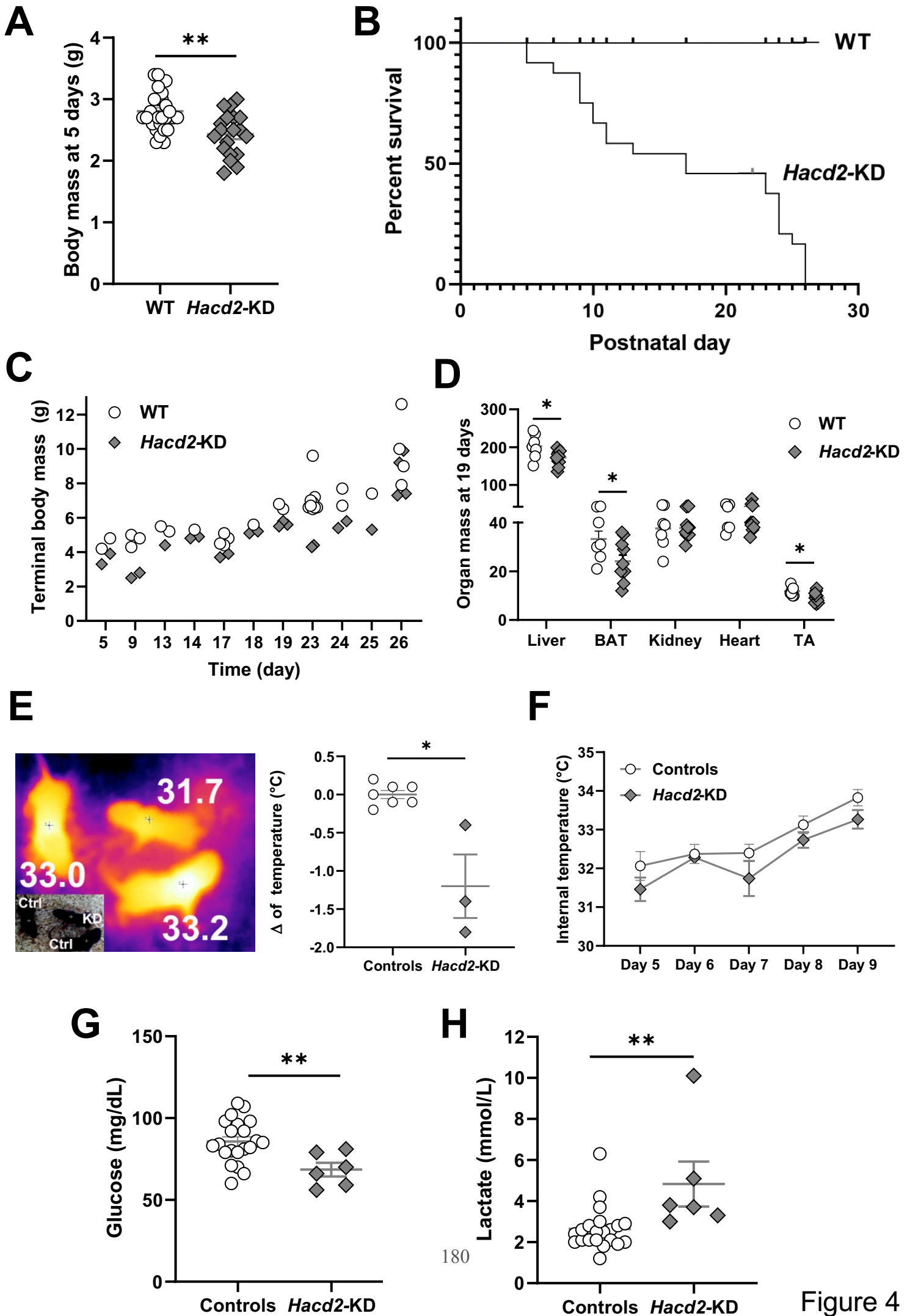


Figure 4

Figure 4 | Postnatal systemic disease of *Hacd2*-KD mice.

(A) Body mass of WT and *Hacd2*-KD pups at P5. **(B)** Percent survival of *Hacd2*-KD pups compared to WT. **(C)** Terminal body mass of *Hacd2*-KD pups compared to WT littermates. For each day, data correspond to *Hacd2*-KD pups euthanized at their terminal stage (humane endpoint), along with their control littermates that were euthanized the same day. **(D)** Mass of liver, brown adipose tissue (BAT), kidney, heart and tibialis anterior muscle (TA) in *Hacd2*-KD mice and their littermates at P19, corresponding to the terminal stage of *Hacd2*-KD mice (humane endpoint). **(E)** Representative thermographic image of the back of an *Hacd2*-KD pup (KD) and two control littermates (ctrl) at P7, and quantification of the deviation of *Hacd2*-KD pups at the highest temperature of the interscapular region compared to controls. **(F)** Internal temperature in control and *Hacd2*-KD mice (*Hacd2*-KD, n = 6 and controls, n = 11). **(G-H)** Glycemia **(G)** and lactatemia **(H)** in *Hacd2*-KD growing pups at P7 and control littermates. Individual data are plotted, along with the mean and standard error of the mean. *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$.

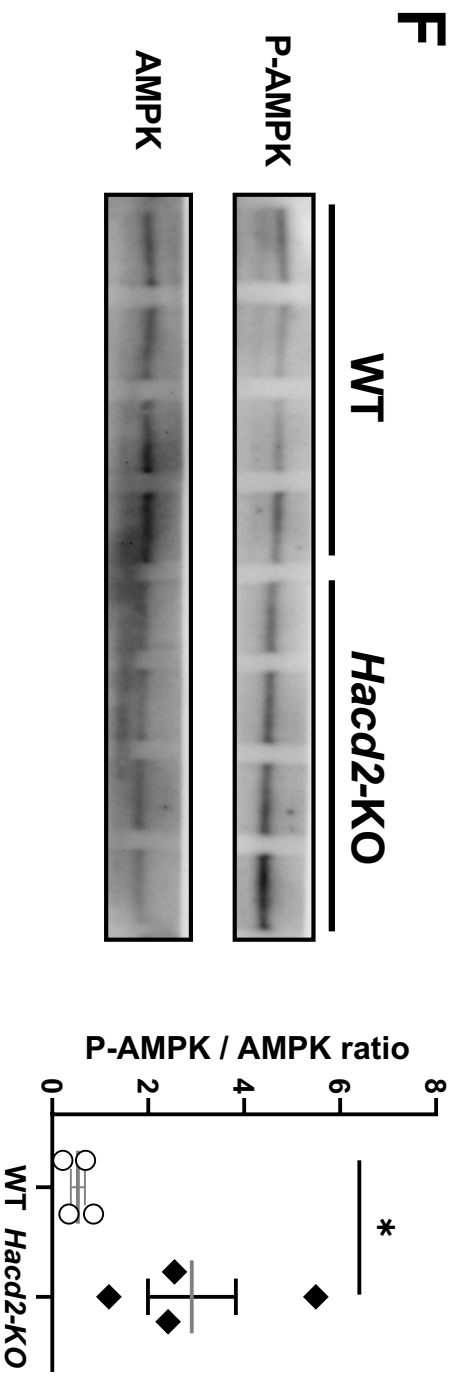
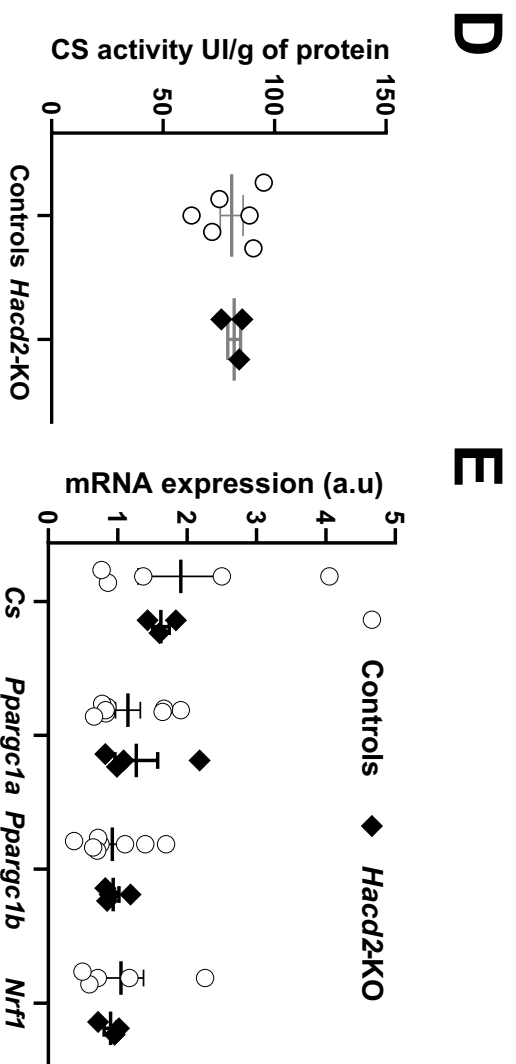
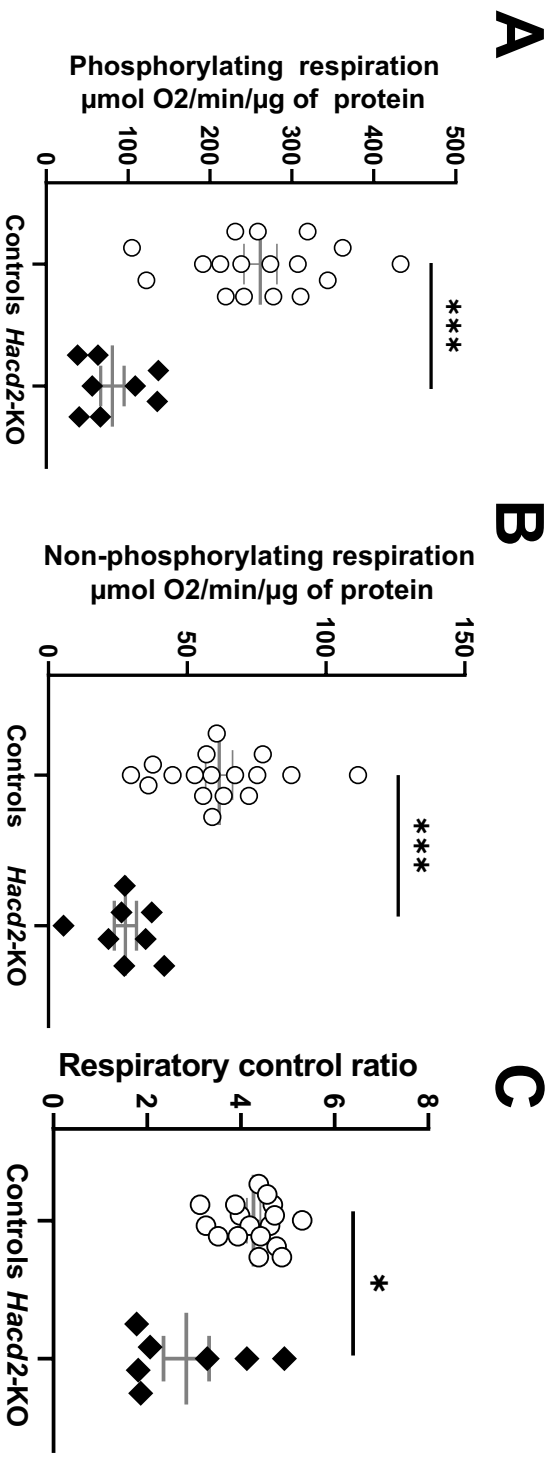


Figure 5 | Impaired mitochondrial function in *Hacd2*-KO embryos.

(A-C) Seahorse oxygraphy analysis of whole embryos homogenates at E9.5. Phosphorylating oxidation rate in the presence of pyruvate, malate, glutamate and succinate (Complex I and II) **(A)**. Non-phosphorylating respiration after the addition of oligomycin **(B)**. Mitochondrial coupling (Respiratory Control Ratio, *i.e.* ratio of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates from **A** and **B**) **(C)**. **(D)** Citrate synthase (CS) activity in whole embryos, as a marker of mitochondrial mass. **(E)** mRNA expression of genes involved in mitochondrial activity (citrate synthase) or biogenesis (*Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Nrf1*), normalized to *Rpl32* mRNA. **(F)** Representative immunoblots and quantification of phospho-AMPK and total AMPK in WT and *Hacd2*-KO embryos. Individual data are plotted, along with the mean and standard error of the mean. *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.001$.

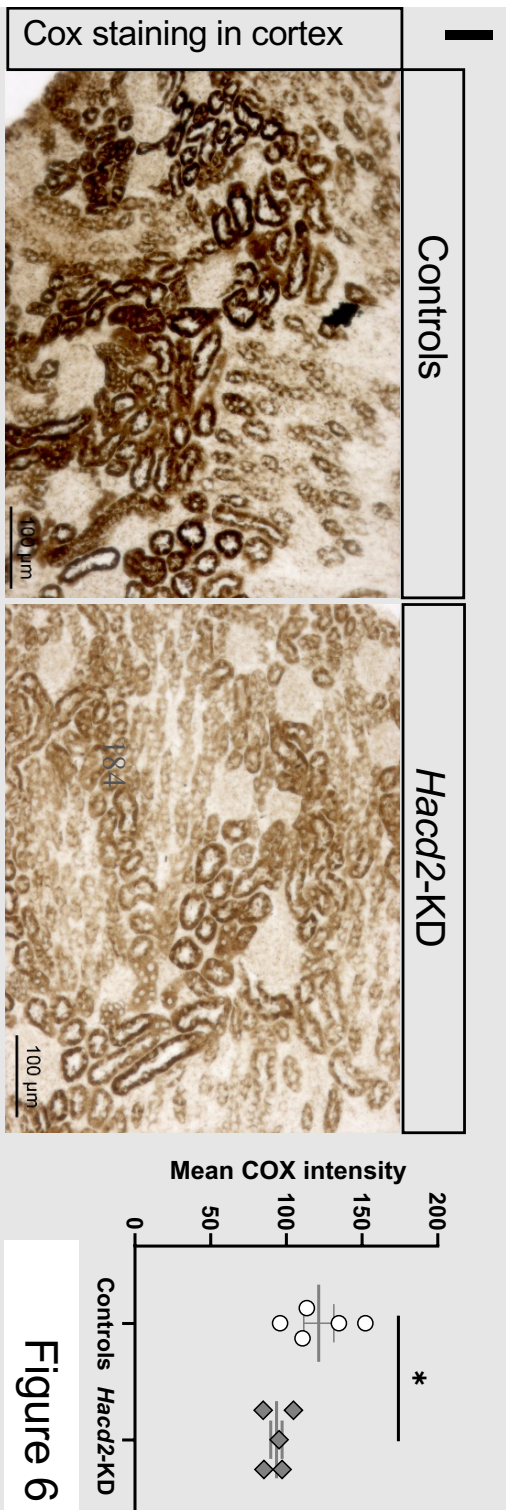
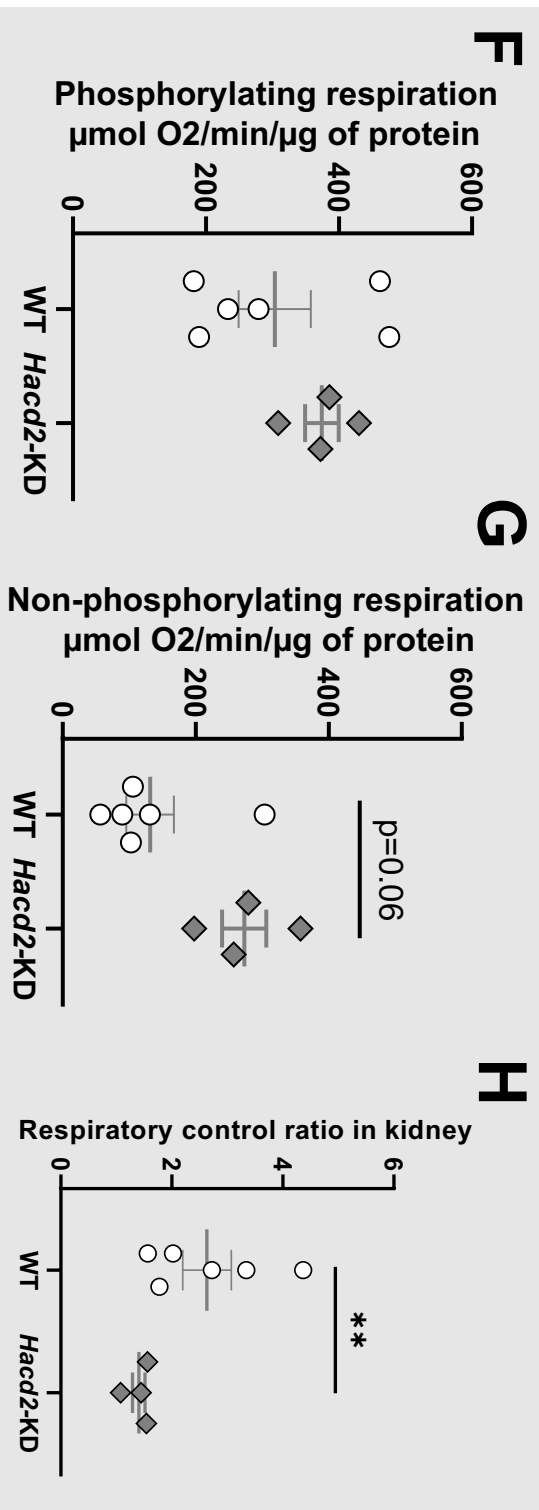
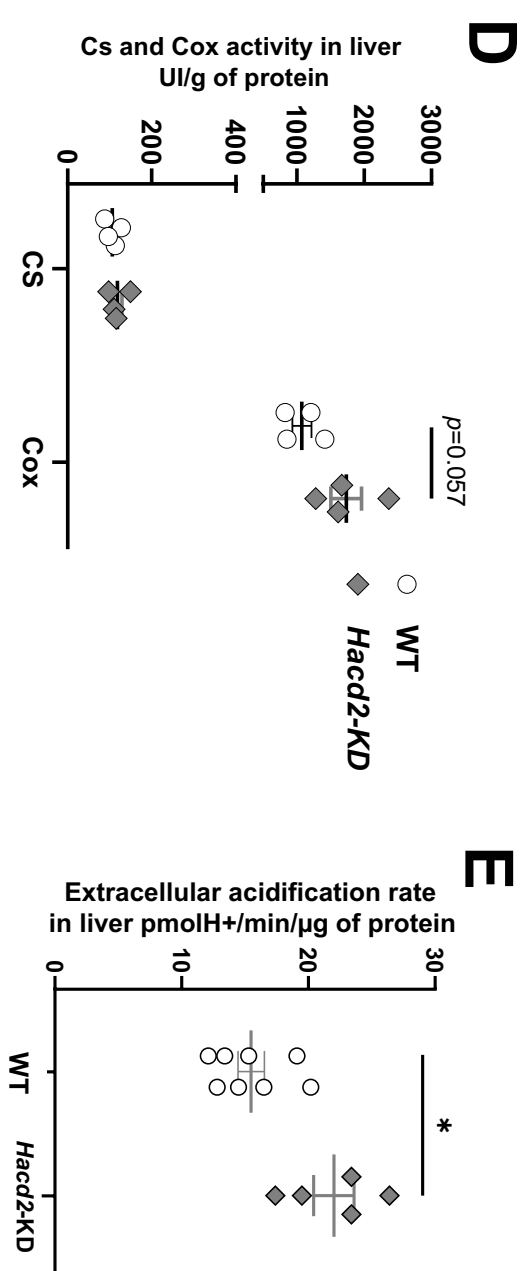
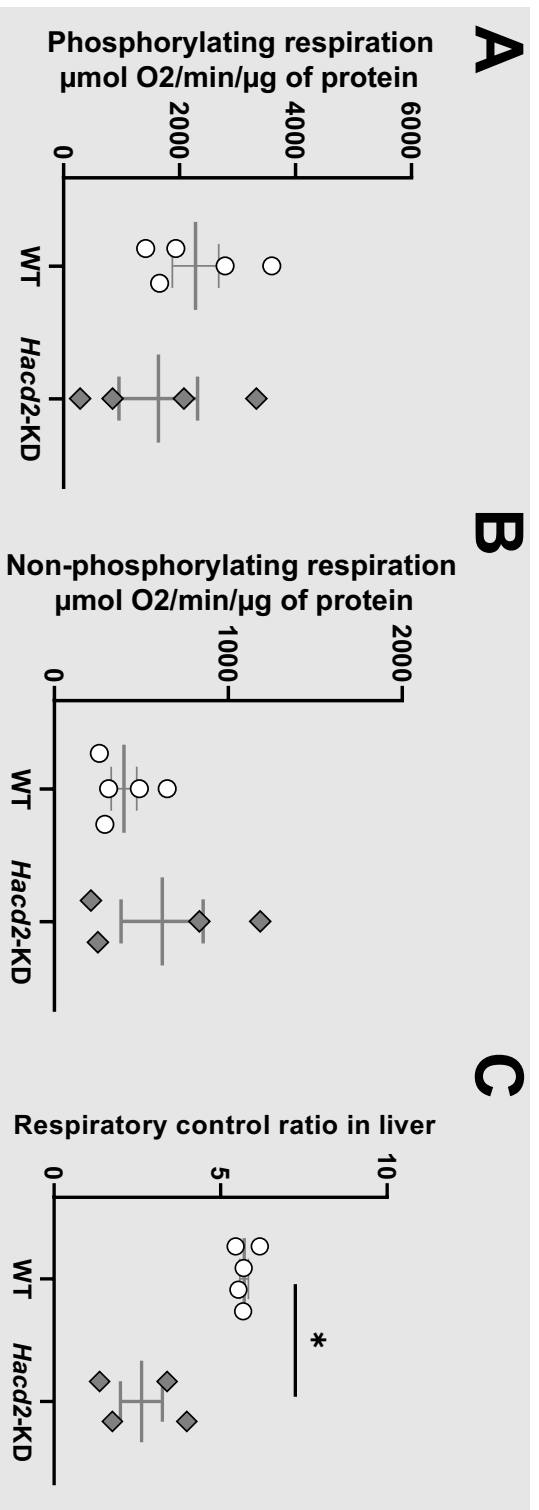


Figure 6

Figure 6 | Impaired mitochondrial function in liver and kidney of *Hacd2*-KD mice.

(A-C) Seahorse oxygraphy analysis on liver homogenates. Phosphorylating oxidation rate in the presence of pyruvate, malate, glutamate and succinate (Complex I and II) **(A)**. Non-phosphorylating respiration after the addition of oligomycin **(B)**. Mitochondrial coupling (Respiratory Control Ratio, *i.e.* ratio of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates from **A** and **B**) **(C)**. **(D)** Citrate synthase (CS) and COX activity in liver. **(E)** Extracellular acidification rate in liver extracts from *Hacd2*-KD pups and their control littermates. **(F-H)** Seahorse oxygraphy analysis on kidney homogenates. Phosphorylating oxidation rate in the presence of pyruvate, malate, glutamate and succinate (Complex I and II) **(F)**. Non-phosphorylating respiration after the addition of oligomycin **(G)**. Mitochondrial coupling (Respiratory Control Ratio, *i.e.* ratio of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates from **F** and **G**) **(H)**. **(I)** COX activity staining in kidney cortex. Data with a grey background (**A-C** and **F-I**) correspond to growing *Hacd2*-KD pups and control littermates while other data correspond to *Hacd2*-KD after growth arrest, and their control littermates (A-C and F-H at P9, I at P14, E at P21, D at P26). Individual data are plotted, along with the mean and standard error of the mean.

*, $P < 0.05$.

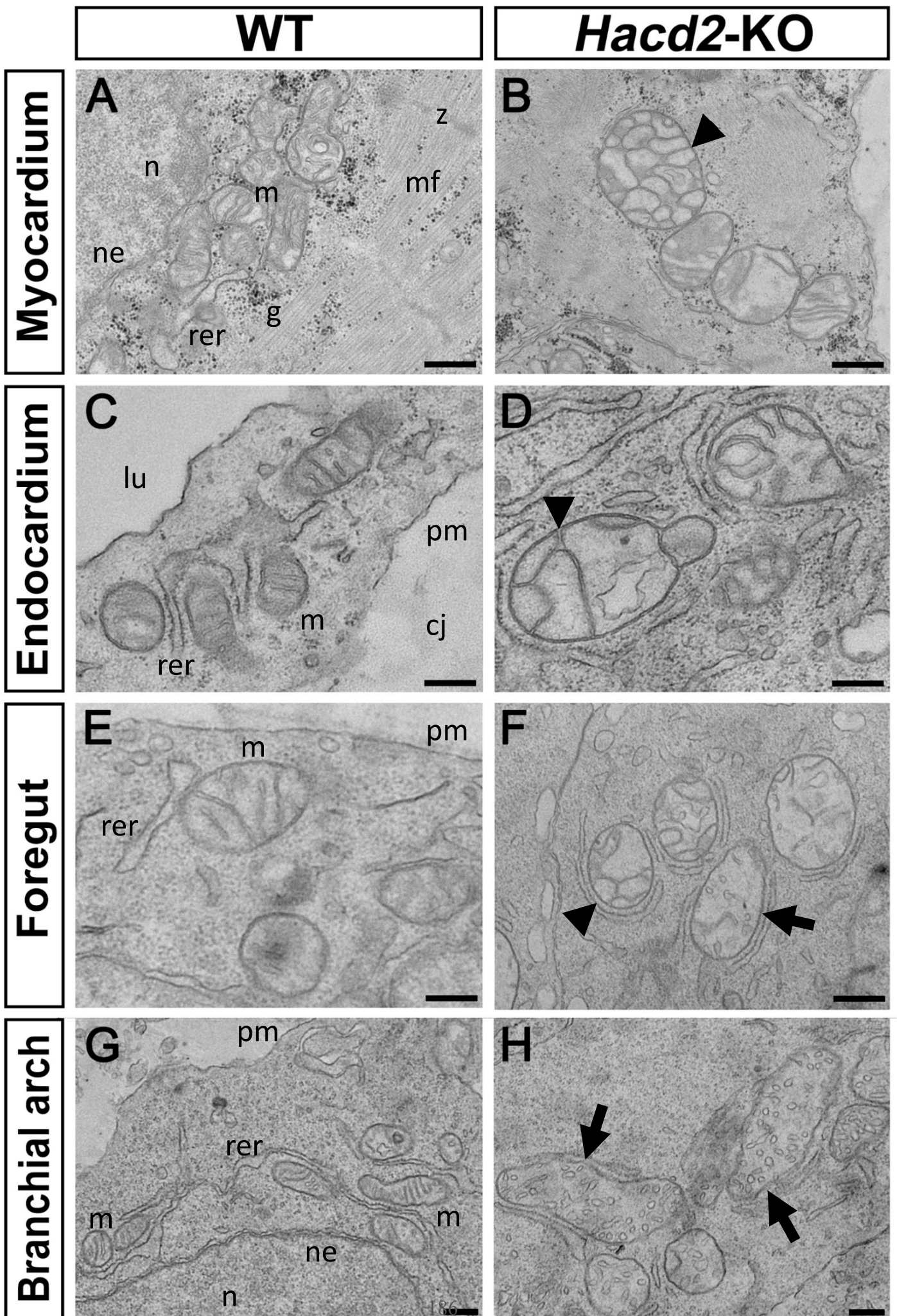


Figure 7

Figure 7 | Impaired mitochondrial organization in *Hacd2*-KO embryos.

(A-H) Transverse sections from E9.5 wild-type (WT) and *Hacd2*-KO embryos were examined by transmission electron microscopy. Images are representative of cells from the myocardium (**A** and **B**), endocardium (**C** and **D**), foregut (**E** and **F**) and branchial arch (**G** and **H**). (**A, C, E** and **G**) Ultrastructural organization of WT cells reveals an active rough endoplasmic reticulum and fields of mitochondria with evidence of tubular-shaped invaginations (cristae) of their internal membrane, unambiguously identified on the same plane than the outer membrane. Myocardial cells are clearly identified by the presence of developing sarcomeres, organized between z-lines, adjacent to numerous glycogen rosettes. (**B, D, F** and **H**) All cell types from age-matched *Hacd2*-KO embryos display a rather normal global organization, with similar cytoplasm, nucleus and rough endoplasmic reticulum membrane systems. However, in all cell types, many mitochondria appear dilated and are abnormally compartmentalized (arrow heads) or present excessive vesiculation of cristae (arrows). cj, cardiac jelly; g, glycogen rosettes; lu, lumen; m, mitochondrion; mf, myofibrils; n, nucleus; ne, nuclear envelope; pm, plasma membrane; rer, rough endoplasmic reticulum and z, z-line. Scale bars are 250 nm.

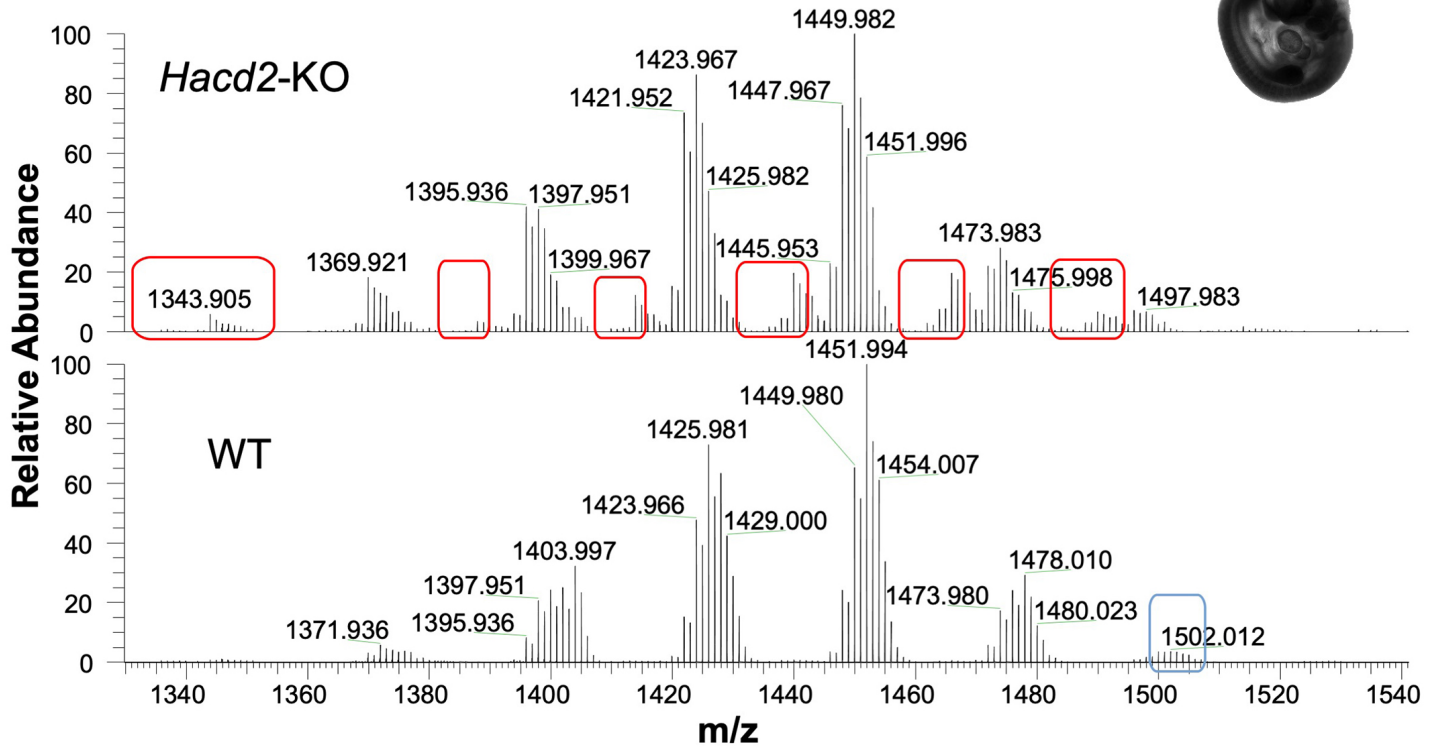
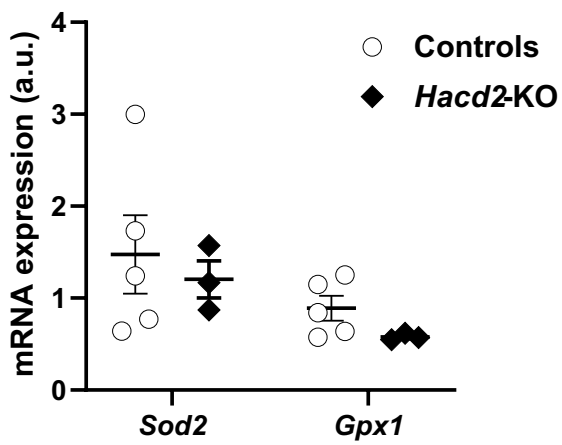
A**B**

Figure 8 | Qualitative remodeling of cardiolipin in E9.5 *Hacd2*-KO embryos.

(A) Representative spectral analysis of cardiolipin (CL) identified by LC/MSⁿ, normalized in each genotype to the highest peak set at 100. Each peak represents the relative abundance of the corresponding m/z related to a specific CL. On this profile, the spectrum of WT embryos is also found in *Hacd2*-KO embryos, but in *Hacd2*-KO the value of the dominant species is globally lowered by 2 m/z points (compare for example 1449.982 to 1451.994), which is explained by the loss of 2 hydrogen atoms during the unsaturation of a bond between two carbons. In addition, the spectrum of *Hacd2*-KO embryos shows additional CL, here outlined in red, very weakly present or undetectable in WT and identified as mono- or di-oxidized CL. Injected samples were extracted from a pool of four WT and four *Hacd2*-KO embryos. **(B)** mRNA expression of genes involved in oxidative stress response, normalized to *Rpl32* mRNA.

Supplementary Tables and Figures

Supplementary Table S1 | Mitochondrial respiration rates of *Hacd2*-KO embryos at E9.5.

Mitochondrial respiration rates for different complexes in control and *Hacd2*-KO embryos at E9.5. RCR: Respiratory Control Ratio. n = 4 WT and 13 *Hacd2*^{+/*KO*} for control embryos and n=8 for *Hacd2*-KO embryos.

Supplementary Table S2 | Mitochondrial respiration rates of WT *Hacd2*-KD mice.

Mitochondrial respiration rates for different complexes in WT and *Hacd2*-KD littermates at P9 for the liver, kidney, *tibialis anterior* muscle (TA), heart, brown adipose tissue (BAT) and white adipose tissue (WAT). RCR: Respiratory Control Ratio. n = 5 for WT mice and n=4 for *Hacd2*-KD mice.

Table S3: Sequence of PCR primers for *Hacd2* alleles genotyping.

Related to Materials and methods.

Each pair of primers gives rise to a PCR product for the corresponding allele. *Hacd2*-KD pair of primers also gives a PCR product for *Hacd2*-KO and *Hacd2*-cKO alleles whereas all other pairs are specific of the corresponding allele.

Table S4: Sequence of other PCR and qPCR primers.

Related to Materials and Methods.

Supplementary Figure S1 | Recombined alleles at *Hacd2* locus.

(A) Organization of *Hacd2* locus after insertion of the targeting vector by homologous recombination, and structure of the resulting *Hacd2^{fllox}* allele. **(B)** Structure of *Hacd2^{KO}* allele after excision of the *Neo* cassette and exon 2 of *Hacd2* gene by a ubiquitous Cre recombinase. **(C)** Structure of *Hacd2^{cKO}* allele after excision of the LacZ and *Neo* cassettes by a ubiquitous Flippase. For each allele, the resulting mRNA and their approximate ratios are indicated. *: stop codon introduced by exon 2 excision and the resulting frameshift.

Supplementary Figure S2 | Expression of *LacZ* reporter gene in cardiac conduction system.

(A) Representative X-Gal staining in the heart from adult WT and *Hacd2^{KO/+}* (HET) mice. Note the diffuse staining in the atria, and the specific staining at the atrioventricular junction and in bundles in the septum consistent with the conduction system. Scale bar=1 mm. **(B)** Histological section in the region of the atrioventricular junction stained with X-Gal (left) or for acetylcholinesterase activity (right) showing a staining consistent with the atrioventricular node.

Supplementary Figure S3 | Recombination induced by *Tek-Cre* and *Mesp1-Cre* recombinases during embryonic development.

(A) Expression of a ubiquitous dual fluorescent protein encoded by the *ROSA^{mTmG}* allele in whole mount embryos at E10.5 for *Tek-Cre* and E9.5 for *Mesp1-Cre*. Without Cre-induced recombination (upper part), a diffuse RFP fluorescence is ubiquitously observed. In embryos expressing Cre recombinase, recombination of the *mTmG* locus shifts RFP to GFP fluorescence in the corresponding cells, *i.e.* in vascular structures

in embryos bearing the *Tek*-Cre transgene (middle part) and in the cardiac structures in embryos bearing the *Mesp1*-Cre transgene (lower part). **(B)** Whole mount pictures of WT and *Hacd2*^{ckO/KO}; *Tek*-Cre⁺ yolk sac and embryos at E10.5. **(C)** Residual mRNA expression of *Hacd2* in the heart of *Hacd2*^{ckO/KO}; *Mesp1*-Cre⁺ adult mice compared to controls.

Supplementary Figure S4 | Histological structure of the kidney, liver and *tibialis anterior* muscle from *Hacd2*-KD mice.

Representative pictures of histological section of kidney, liver and *tibialis anterior* (TA) muscle of *Hacd2*-KD growing pups and WT littermates at P14 stained with hematoxylin and eosin. Scale bars are 50 μ m for kidney and liver and 20 μ m for TA.

Supplementary Figure S5 | Impaired mitochondrial function in brown adipose tissue, liver and kidney of *Hacd2*-KD mice.

(A-C) Seahorse oxygraphy analysis on brown adipose tissue homogenates. Phosphorylating oxidation rate in the presence of pyruvate, malate, glutamate and succinate (Complex I and II) **(A)**. Non-phosphorylating respiration after the addition of oligomycin **(B)**. Mitochondrial coupling (Respiratory Control Ratio, *i.e.* ratio of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates from **A** and **B**) **(C)**. **(D)** mRNA expression of genes involved in mitochondrial activity (citrate synthase) or biogenesis (*Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Nrf1*, *Tfam*) in liver, normalized to *Rpl32* mRNA. **(E)** Citrate synthase (CS) and COX activity in kidney. **(F)** mRNA expression of genes involved in mitochondrial activity (citrate synthase) or biogenesis (*Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Nrf1*, *Tfam*) in kidney, normalized to *Rpl32* mRNA. **(G)** Extracellular acidification rate in kidney extracts from *Hacd2*-KD pups and their control littermates. Data with a grey background **(A-C)** cor-

respond to growing *Hacd2*-KD pups and control littermates while others (D-G) correspond to *Hacd2*-KD after growth arrest, and their control littermates (A-C at P9, G at P21, D-F at P26). Individual data are plotted, along with the mean and standard error of the mean. *, $P < 0.05$.

Supplementary Movie S1 | Cardiovascular defects in a E10.5 *Hacd2*-KO embryo.

Representative *Hacd2*-KO embryo at E10.5 with delayed development and growth retardation. Compared to a control embryo, there is a very weak staining of the embryonic vessels by red blood cells, which can be seen sedimented in the edematous pericardial cavity. The heart, which still has the U-tube shape of a E8.5 embryo, is animated by rhythmic contractions and contains no blood cells either.

Table S1: Mitochondrial respiration rates of *Hacd2*-KO embryos at E9.5.

	Control embryos	<i>Hacd2</i>-KO embryos	<i>P</i>
Complex I	72,5 ± 6,4	39,7 ± 11,7	0,02
Complex I+II	261,6 ± 20,0	80,7 ± 14,3	<10 ⁻³
Complex II	194,0 ± 20,7	51,0 ± 12,3	<10 ⁻³
+ Oligomycin	61,5 ± 4,9	27,8 ± 4,0	<10 ⁻³
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	4,3 ± 0,1	2,8 ± 0,5	0,02

Table S2: Mitochondrial respiration rates of WT and *Hacd2*-KD mice.

Liver	WT	<i>Hacd2</i>-KD	<i>P</i>
Complex I	1424,8 ± 325,5	1641,4 ± 742,2	0,90
Complex I+II	2277,4 ± 401,8	1635,8 ± 676,4	0,555
Complex II	852,6 ± 312,5	-5,6±757,6	0,292
+ Oligomycin	400,6 ± 73,8	620,1 ± 236,2	0,999
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	5,7 ± 0,1	2,6±0,6	0,015
Kidney			
Complex I	178,8 ± 35,8	348,8 ± 35,5	0,038
Complex I+II	303,6 ± 54,2	374,3 ± 25,2	0,476
Complex II	124,8 ± 22,9	25,5 ± 52	0,083
+ Oligomycin	131,6 ± 35,8	273,1 ± 33,1	0,066
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	2,6 ± 0,4	1,4 ± 0,1	0,009
TA			
Complex I	4,2 ± 0,8	8,8 ± 3,9	0,196
Complex I+II	64,1 ± 10,7	69,5 ± 17,9	0,790
Complex II	60 ± 10,9	60,7 ± 17,1	0,969
+ Oligomycin	31,1 ± 5,3	32,2 ± 8	0,922
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	2,1 ± 0,1	2,1 ± 0,1	0,713
Heart			
Complex I	2344,2 ± 413,3	2022,3 ± 658,8	0,675
Complex I+II	3259,9 ± 681,8	2327,7 ± 252,1	0,353
Complex II	915,7 ± 446,1	304,7 ± 605,4	0,441
+ Oligomycin	1574,8 ± 329,1	1164,9 ± 412	0,470
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	2,2 ± 0,3	2,4 ± 0,6	0,673
BAT			
Complex I	6179,2 ± 1060,2	2819,4 ± 621	0,06
Complex I+II	8539,4 ± 1633,8	4100,3 ± 595,4	0,031
Complex II	2360,3 ± 878	1280,9 ± 211,2	0,322
+ Oligomycin	4598,2 ± 966,7	2241,9 ± 307,9	0,030
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	1,9 ± 0	1,8 ± 0	0,255
WAT			
Complex I	13,9 ± 5,4	19,9 ± 6,8	0,521
Complex I+II	29,5 ± 11,4	42,6 ± 17,8	0,541
Complex II	18,4 ± 6,7	22,7 ± 11,3	0,739
+ Oligomycin	17,1 ± 7,1	23 ± 8,5	0,607
RCR (Complex I+II /+ Oligomycin)	1,8 ± 0,2	1,8 ± 0,2	0,832

Table S3: Sequence of PCR primers for *Hacd2* alleles genotyping.

Related to Materials and methods.

Each pair of primers gives rise to a PCR product for the corresponding allele.

Hacd2-KD pair of primers also gives a PCR product for *Hacd2*-KO and *Hacd2*-cKO alleles.

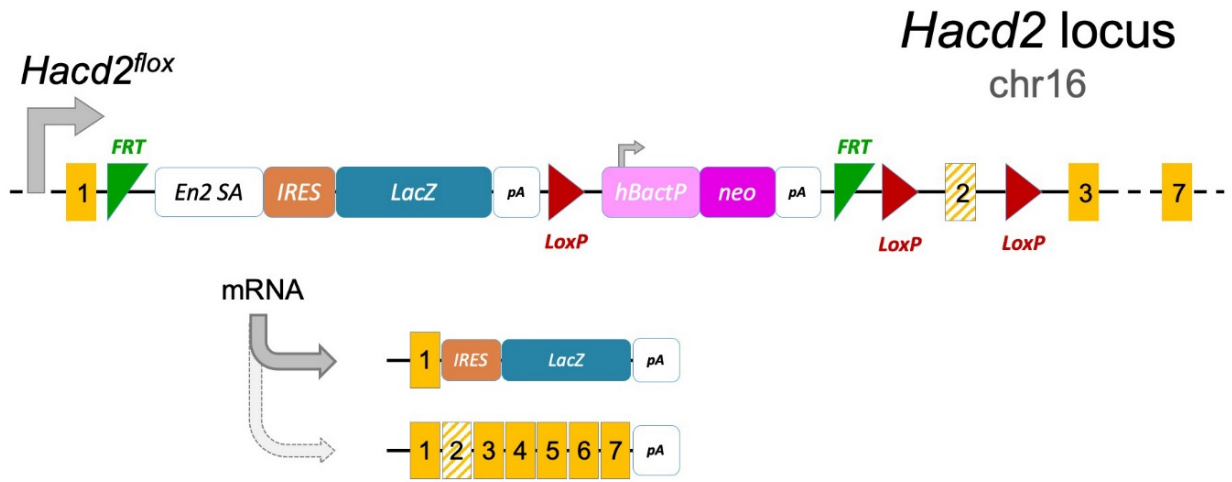
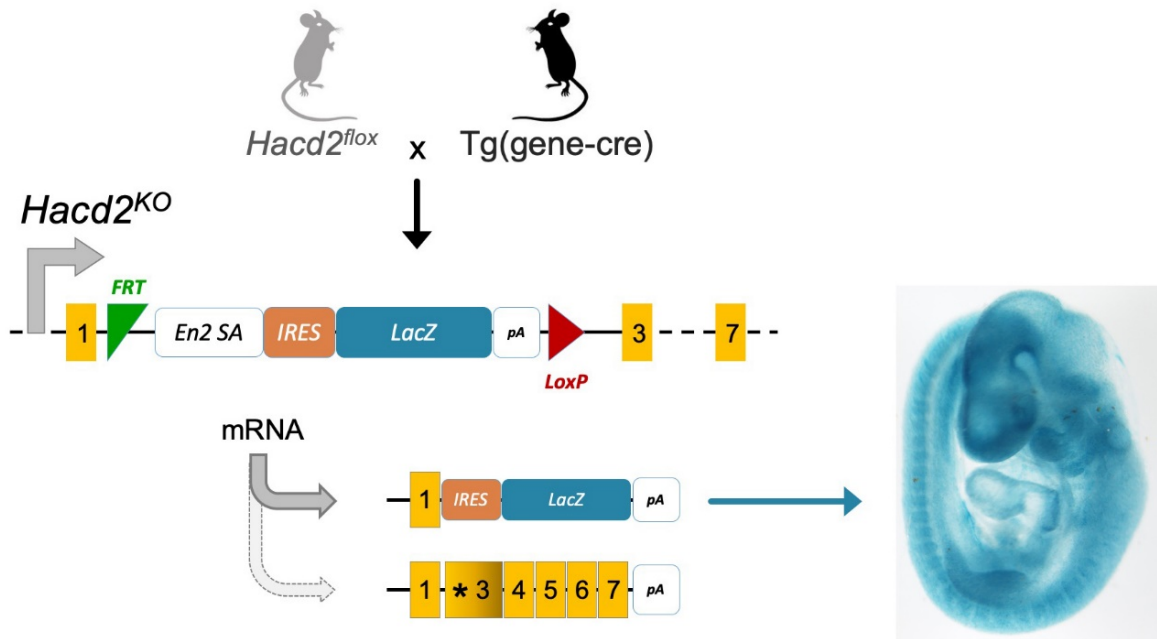
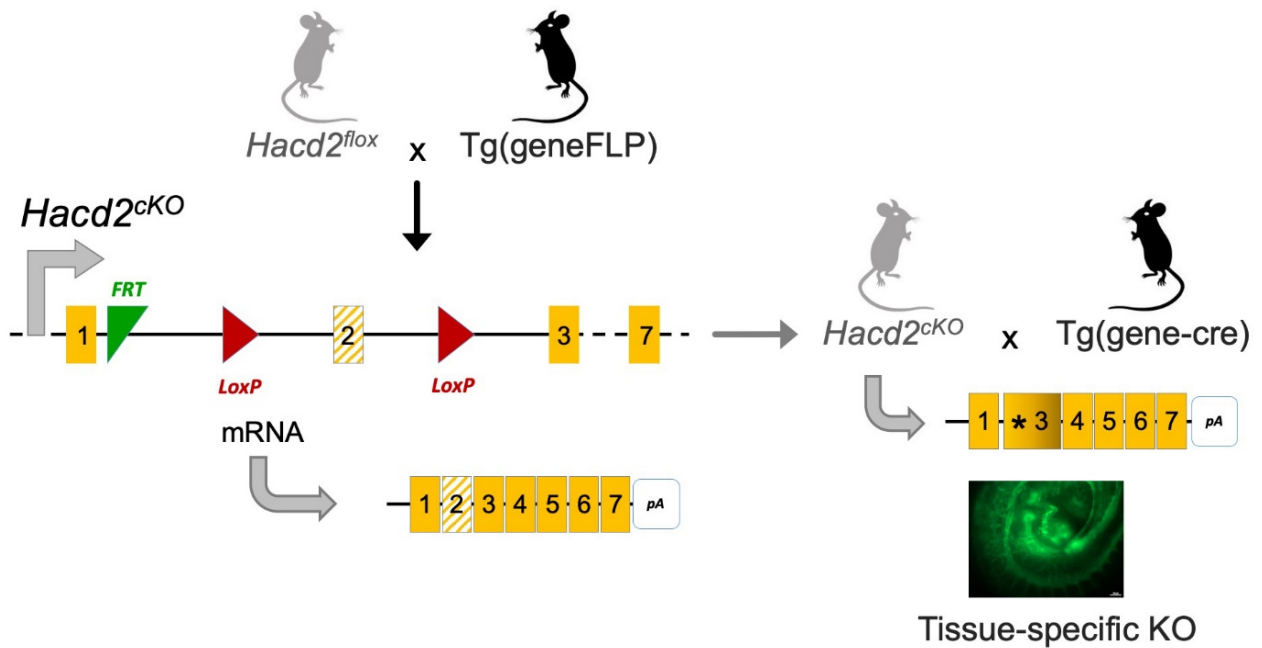
All other pairs are specific of the corresponding allele.

Allele	Forward primer	Reverse primer
<i>Hacd2</i> -WT	CTCCAGCTTTAAAGGAAATCAAATG	GATGCCTCAGGCAGGTTTCAGC
<i>Hacd2</i> -KD	ACGAAGTTATGGTCTGAGCTCGC	GATGCCTCAGGCAGGTTTCAGC
<i>Hacd2</i> -KO	CCACACCTCCCCCTGCAACCTG	GATGCCTCAGGCAGGTTTCAGC
<i>Hacd2</i> -cKO	GATGCCTCAGGCAGGTTTCAGC	GCTGGGTCTATAGATATCTCGAC

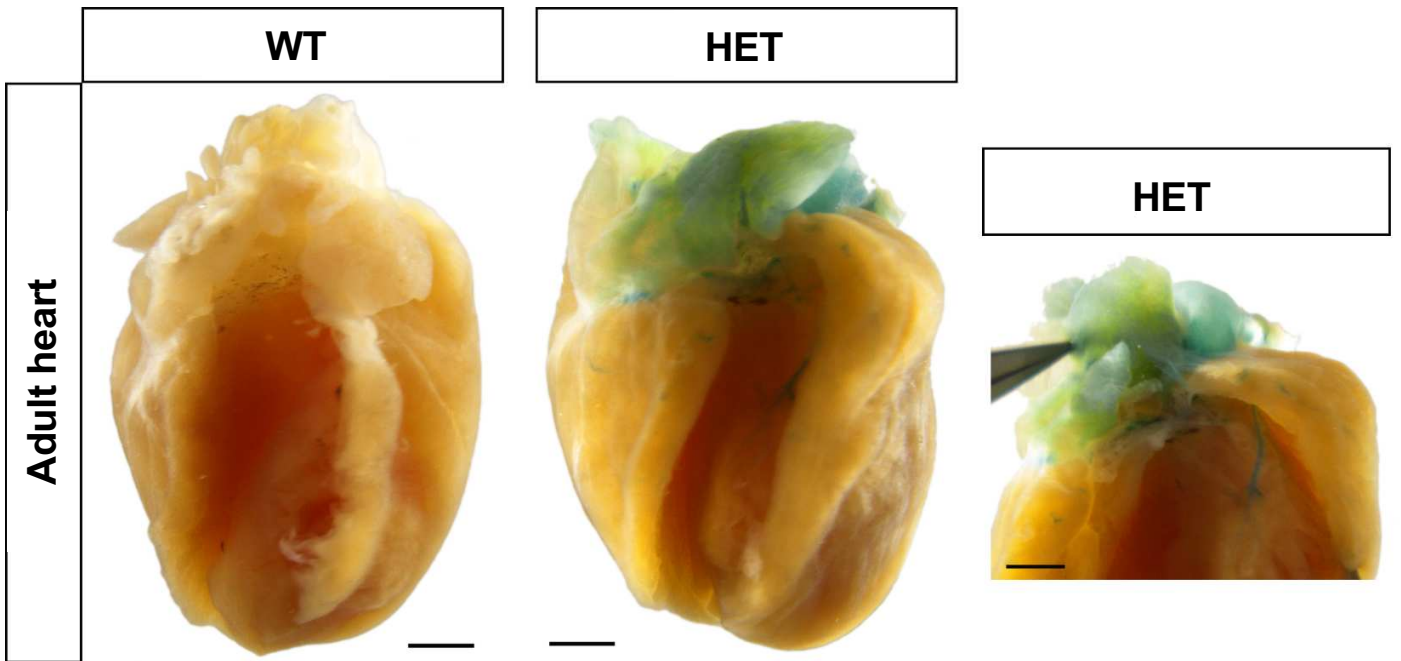
Table S4: Sequence of other PCR and qPCR primers.

Related to Materials and methods.

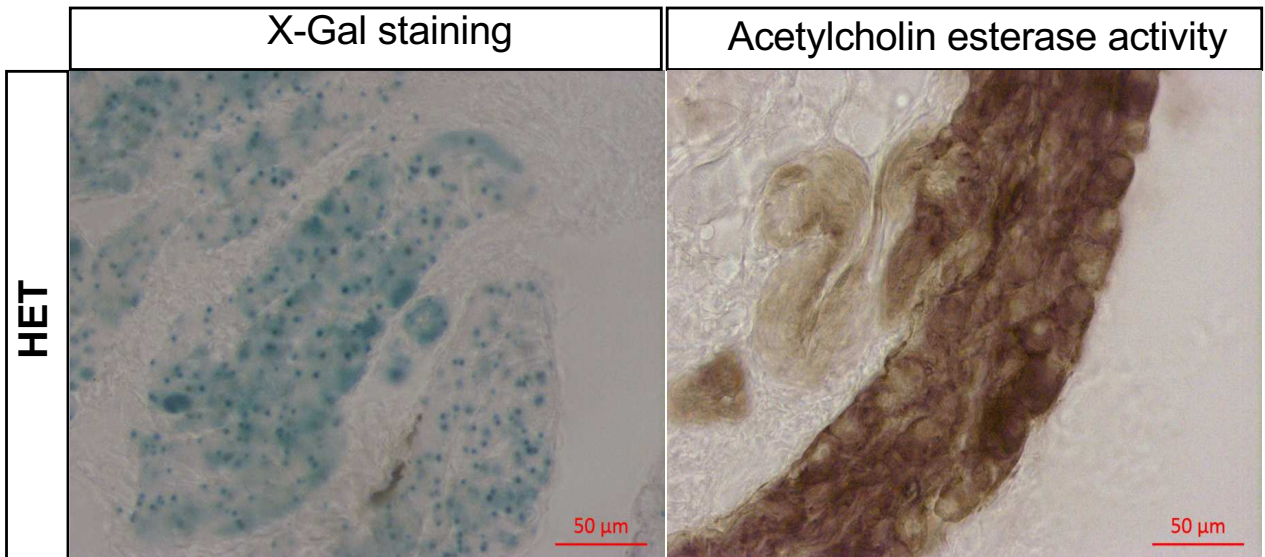
Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Hacd2</i>	TGCTATAGGGATTGTGCCATC	ACGGATAATTTCCGTGATTGTCC
<i>Actin</i>	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	GGTTCTCAAACATGATCTGGG
<i>CS</i>	CAAGATTGTGCCCAATATCCTC	TTCATCTCCGTCATGCCATA
<i>Ppargc1a</i>	AGACAGCTTTCTGGGTGGA	GCTAGCAAGTTTGCCTCATT
<i>Ppargc1b</i>	TGGAAAGCCCCTGTGAGAGT	TTGTATGGAGGTGTGGTGGG
<i>Nrf1</i>	TACTCTGCTGTGGCTGATGG	CCTCTGATGCTTGCCTCGTCT
<i>Tfam</i>	GCTGATGGGTATGGAGAAG	GAGCCGAATCATCCTTTGC
<i>Sod2</i>	AGGAGCAAGGTCGCTTACAG	GTAGTAAGCGTGCTCCCACA
<i>Gpx1</i>	GTTTCCCGTGCAATCAGTTC	TCACTTCGCACTTCTCAAACA
<i>Rpl32</i>	GCT GCT GAT GTG CAA CAA A	GGG ATT GGT GAC TCT GAT GG
<i>FLP</i>	CCAATTCCTCTTCTAGCTACTTTTCATCAATT GTG	GGTATTCTGTTTGTGCTTGAAGAATTGC CGGTC
<i>Cre</i>	GGACATGTTTCAGGGATCGCCAGGCG	GCATAACCAGTGAAACAGCATTGCTG

A**B****C**

A



B



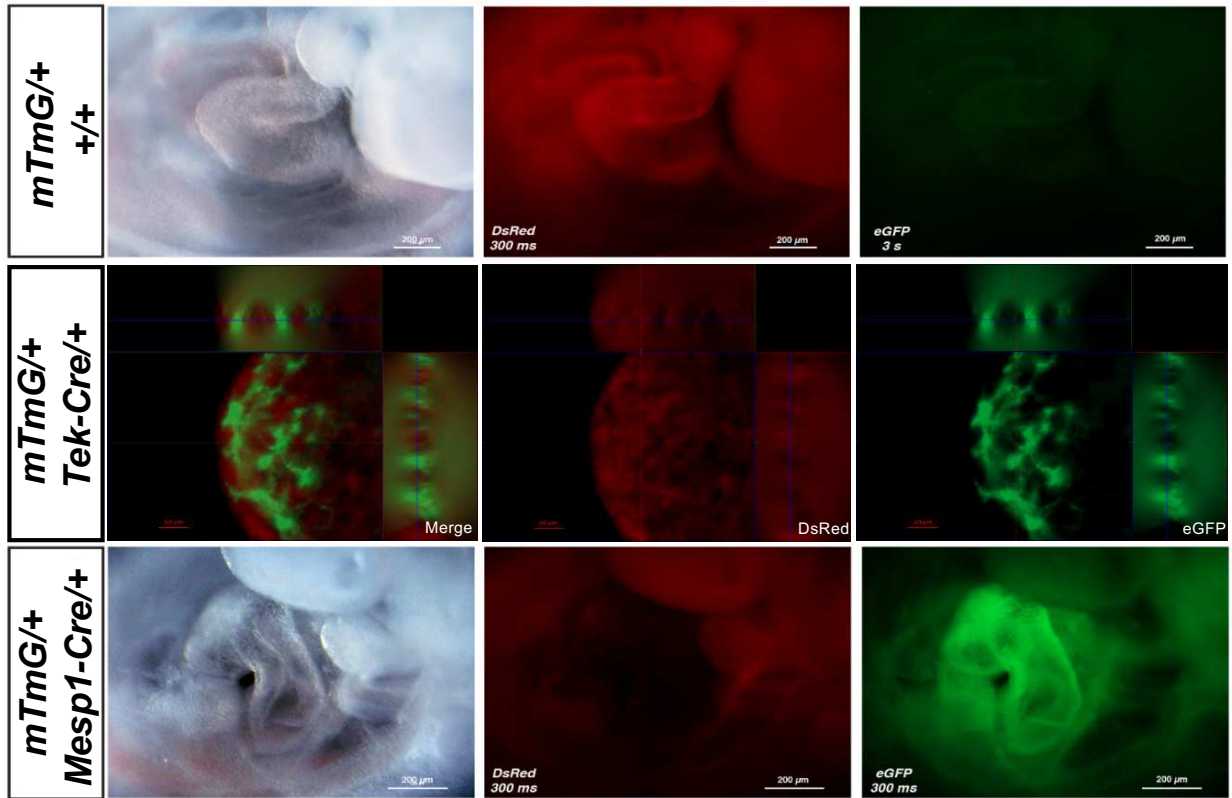
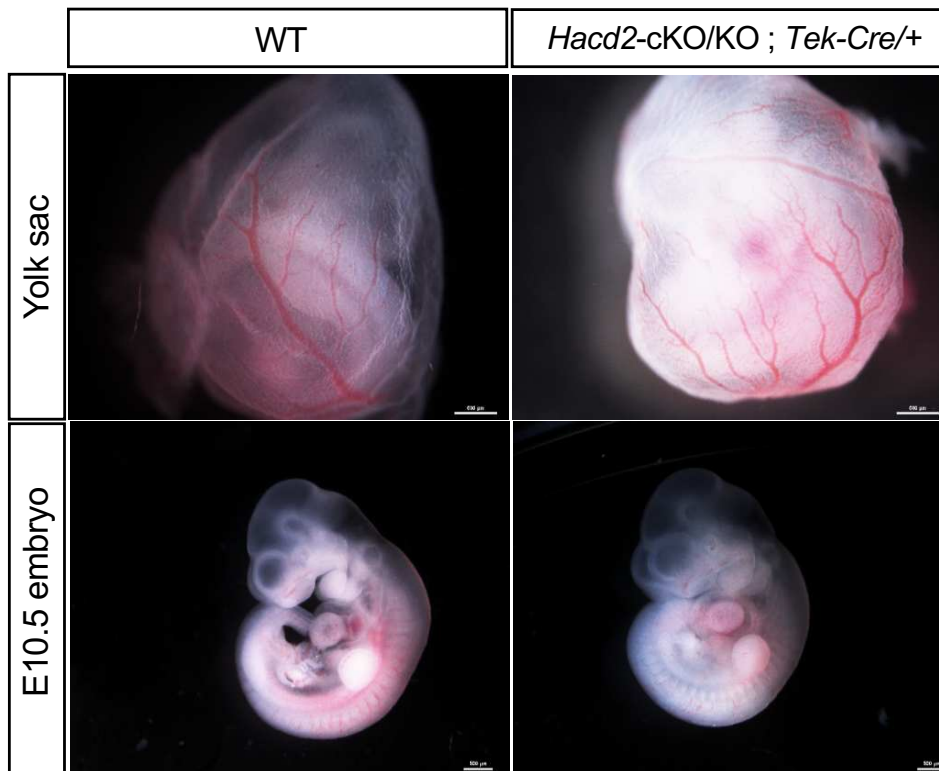
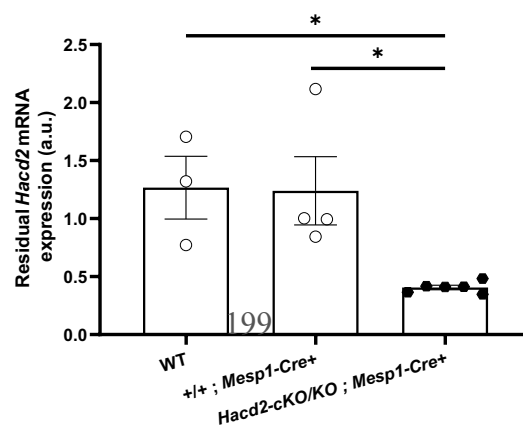
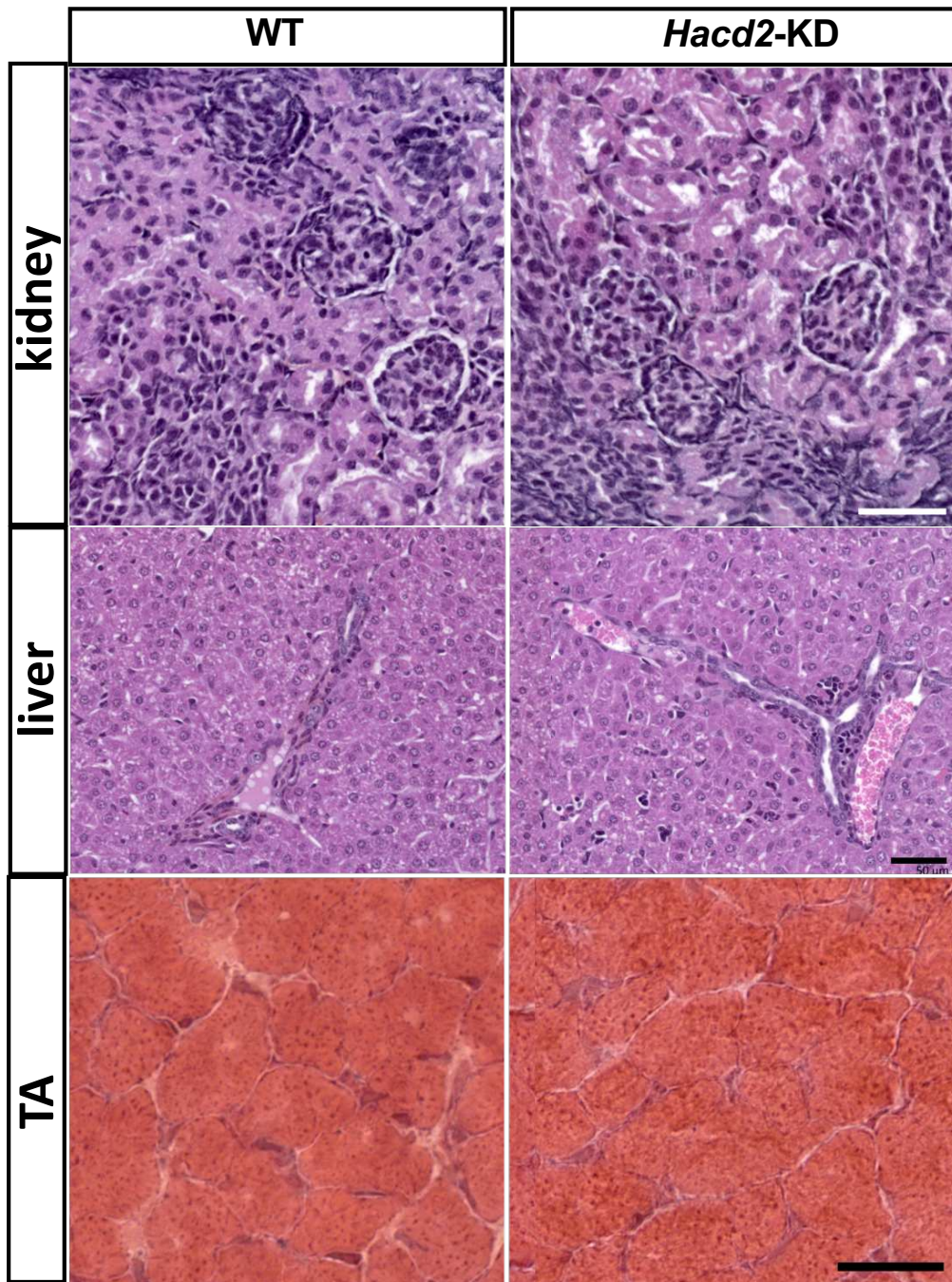
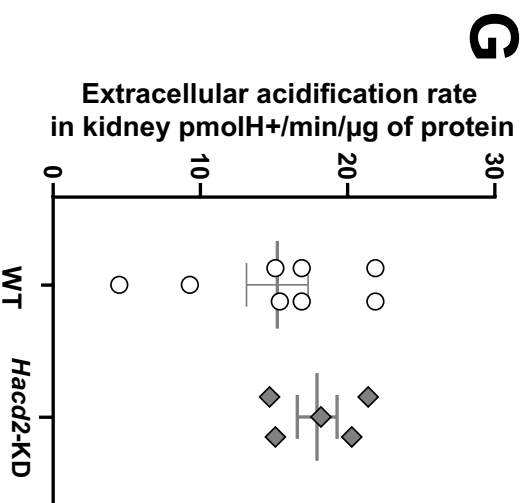
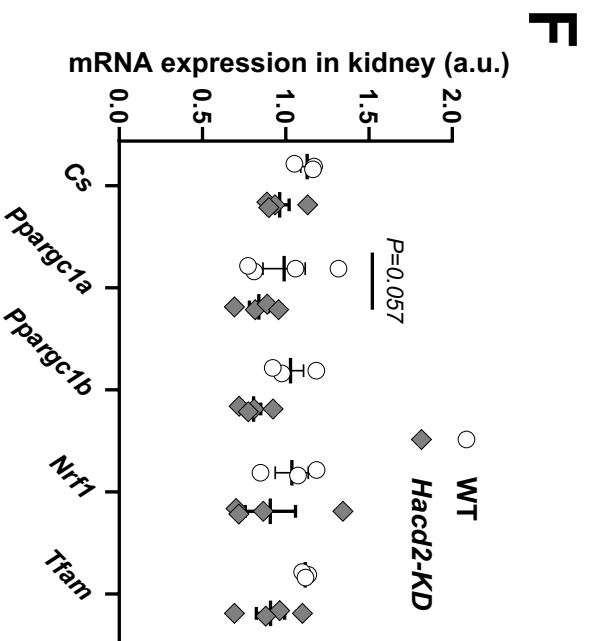
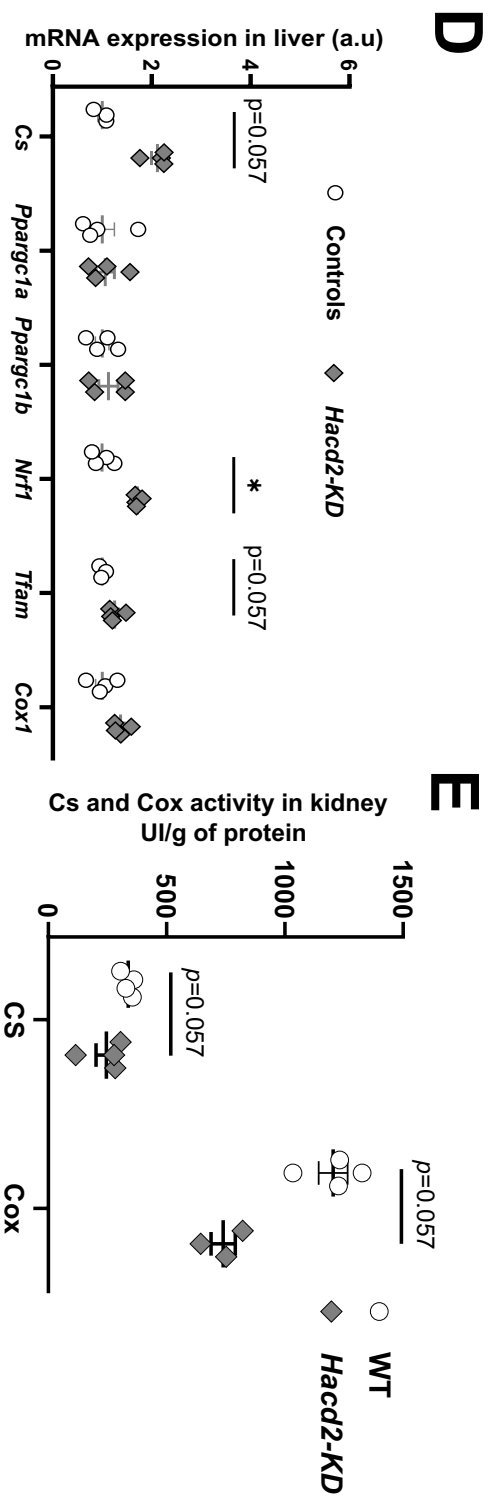
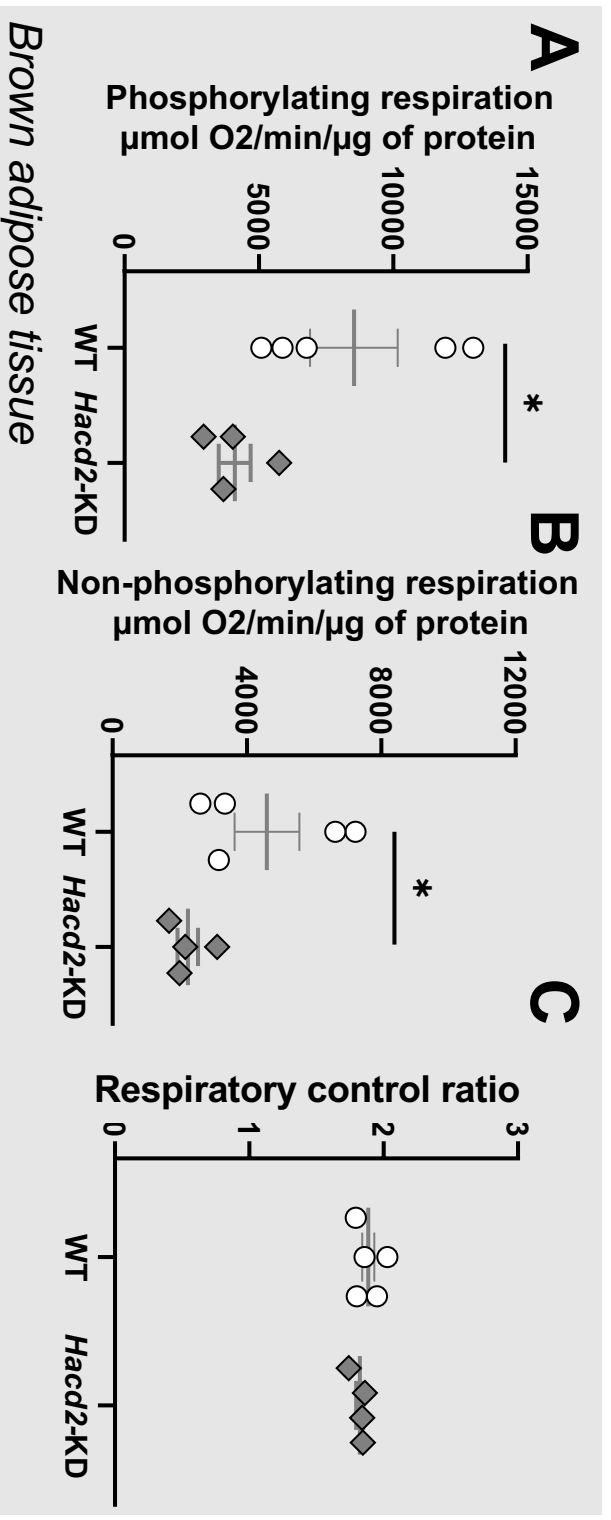
A**B****C**

Figure S3





PUBLICATION 2 : *HACD2* DEFICIENCY IN MICE CAUSES ICTHYOSIS AND ATROPHY OF SEBACEOUS GLANDS, TO BE SUBMITTED

Problématique

En parallèle de leur défaillance mitochondriale dans le foie et les reins, les souris *Hacd2*-KD développent une ichtyose au niveau de la queue et des membres postérieurs. La peau est une barrière essentielle contre l'extérieur, qui protège entre autres des infections, mais aussi contre la déshydratation; ceci est d'autant plus vrai chez les individus jeunes dans les premières semaines post-natales. Pour maintenir cette capacité d'imperméabilisation, des lipides particuliers sont essentiels, notamment des céramides. La famille des *Elovl*, qui catalysent la première étape d'élongation des AGTLC, et en particulier *Elovl1* et *Elovl4*, ont montré précédemment l'importance de ces lipides dans l'homéostasie de la peau, puisque la délétion de ceux-ci provoque des défauts de la barrière cutanée et une mort dans les heures suivant la naissance par déshydratation (Agbaga et al., 2010; Aldahmesh et al., 2011; Harkewicz et al., 2012). *Elovl3* est quant à elle nécessaire au fonctionnement des glandes sébacées (Westerberg et al., 2004). *Hacd2* catalysant quant à lui la troisième étape du processus, et vue la présence d'ichtyose chez les individus *Hacd2*-KD, nous avons cherché à caractériser cette atteinte dans notre modèle.

Résultats

Nous avons précédemment montré une expression d'*Hacd2* dans la peau ; une étude plus approfondie a permis de préciser que celle-ci est particulièrement forte dans les glandes sébacées associées aux follicules pileux. Histologiquement, une coupe transverse de peau dans les zones atteintes confirme une ichtyose, avec un épaissement de l'épiderme, mais révèle également à une atrophie quasi-complète des glandes sébacées. Cette diminution de la quantité de sébum explique que les poils deviennent cassants et secs, par défaut de lubrification. Ces signes visibles s'accompagnent d'une modification de la composition des céramides de la peau, avec une proportion d'acides gras mono- et poly-insaturés diminuée en faveur d'une augmentation d'acides gras saturés. L'analyse des céramides nécessaires à l'imperméabilité de la peau (O-acyl-céramides) est encore en cours.

Conclusion - discussion

Par cette étude, nous confirmons l'importance du rôle du gène *Hacd2* dans le maintien de la barrière cutanée et des glandes sébacées, comme cela était suggéré par les délétions de plusieurs gènes *Elovl*. Cette étude suggère donc d'inclure *Hacd2* parmi les gènes candidats en cas d'ichtyose congénitale.

Ma contribution

Dans cette étude, j'ai participé à toutes les étapes de prélèvements sanguins et tissulaires ; j'ai aussi réalisé les hématocrites.

***Hacd2* deficiency in mice causes ichthyosis and atrophy of sebaceous glands**

Nahed Khadhraoui^{1,2,3}, Jordan Blondelle^{1,2,3*}, Aymeline Vandestienne^{1,2,3*}, Edouard Reyes Gomez⁴, Guillaume Courtin^{1,2,3}, Alexandre Prola^{1,2,3}, Laurent Guillaud^{1,2,3}, Jean-Luc Servely⁴, Frédéric Relaix^{1,2,3}, Laurent Tiret^{1,2,3#}, Fanny Pilot-Storck^{1,2,3#}

* these two authors contributed equally

contact authors

¹ Univ Paris Est Creteil, INSERM, IMRB, Team Relaix, F-94010 Creteil, France.

² EnvA, IMRB, F-94700 Maisons-Alfort, France.

³ EFS, IMRB, F-94010 Creteil, France.

⁴ Biopôle, École nationale vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, F-94700, France

Abstract

Skin ensures an essential protective role towards desiccation that relies on a close interplay between cell layers and specific lipid structures. In particular, skin ceramides are indispensable to the skin permeability barrier and alterations in their synthesis lead to ichthyosis, a large group of diseases ranging from mild forms of scaly and dry skin to lethal forms of water loss at birth. Specific enzymes have been identified for skin ceramides synthesis and the involvement of the very long chain fatty acid (VLCFA) elongation cycle has been demonstrated by the fact that both ELOVL1 and ELOVL4 elongases, which participate to its first step, are necessary for proper skin ceramides synthesis. Here we provide evidence that deficiency in the *Hacd2* gene that encodes an enzyme for the third step of the VLCFA elongation cycle provokes an early ichthyosis in mice, along with an atrophy of sebaceous glands, resulting in fragile hair, scaly skin and eventually tail tip necrosis. We show that the *Hacd2* gene is strongly expressed in skin and that upon its deficiency, skin ceramides species display an altered repartition while their fatty acids are shifted towards saturated chains, at the expense of both monounsaturated and polyunsaturated chains. These results identify *Hacd2* as a new gene belonging to the lipid synthesis pathways as essential for skin homeostasis.

Keywords

SFA, MUFA, PUFA, hyperkeratosis, lipid lamellae, stratum corneum, O-acyl-ceramides

Introduction

Specialized organization of skin forms a permeability barrier that prevents water loss in terrestrial conditions (Breiden and Sandhoff, 2014; Kendall et al., 2017; Uchida and Holleran, 2008). Alteration of skin permeability barrier compromises this essential role, leading to ichthyosis, a heterogeneous group of diseases ranging from mild to life-threatening forms (Akiyama, 2017; Elias et al., 2012; Kihara, 2016). The most severe forms lead to death because of severe dehydration following trans-epidermal water loss whereas mild forms are accompanied by compensatory hyperkeratosis that manifests in a scaly and dry aspect of skin. Depending on the involved mutation, ichthyosis can be isolated or part of a syndromic disease (Elias et al., 2012). Functional skin permeability barrier relies on precise organization of the outermost part of the epidermis, the stratum corneum, in a stratified arrangement of corneocytes and lipid lamellae that contain cholesterol, free fatty acids and ceramides (Akiyama, 2017). Epidermal ceramides present a specific composition compared to non-skin ceramides, with abundant very long (VLCFA, $\geq C20$) and ultralong chain fatty acids (ULCFA, $\geq C28$) fatty acids that confer high hydrophobicity to the stratum corneum (Akiyama, 2017; Kihara, 2016). In addition, most ceramides comprising ULCFA are hydroxylated on ω position, esterified with linolenic acid (C18:2) and covalently bound to corneocyte envelope, further sealing the skin permeability barrier (Akiyama, 2017; Kihara, 2016).

The essential role of these specific lipids in skin permeability barrier is exemplified by the fact that apart from keratin-encoding genes, most genes involved in ichthyosis are part of lipid synthesis pathways (Akiyama, 2017; Vahlquist et al., 2018). In the upstream steps of ceramide synthesis stands the elongation of VLCFA and ULCFA. Synthesis of fatty acids from C18 requires a specific four-step process performed by ER-resident enzymes, forming the so-called VLCFA elongation cycle (Kihara, 2016; Sassa and Kihara, 2014). First step of this cycle is performed by

elongases called ELOVL proteins, which are encoded by seven different genes and exhibit individual specificities regarding substrate preferences and tissue expression pattern (Ohno et al., 2010). In particular, the ubiquitous ELOVL1 protein efficiently elongates fatty acids up to C26 whereas ELOVL4, which expression is restricted to skin, testis and brain, is the only elongase able to elongate \geq C26 FA, up to C38 FA (Kihara, 2016; Ohno et al., 2010). Both elongases are essential since their deletion in mice leads to neonatal death due to severe defect skin permeability barrier, and hence dehydration (Agbaga et al., 2008; Cameron et al., 2007; Li et al., 2007; McMahon et al., 2007; Sassa et al., 2013; Vasireddy et al., 2007). Interactions were shown with *CerS2* and *CerS3* genes that encode ceramide synthases (Kihara, 2016; Sassa et al., 2013). *CERS3* is exclusively required for synthesis of ceramides comprising ULCFA and its deficiency similarly leads to neonatal death due to skin permeability barrier defect (Jennemann et al., 2012). *Des1*, *Dgat2*, *Cyp4F22* and *PNPLA1* genes are further required for specific steps ultimately ending in acyl-ceramide synthesis and their deficiency also impairs skin permeability barrier (Grond et al., 2017; Holland et al., 2007; Ohno et al., 2015; Stone et al., 2004).

In parallel to epidermis-derived lipids, skin contains another specific pool of lipids secreted by sebaceous glands, made of cholesterol esters, triglycerides and wax esters (Pappas, 2009). Because of its high hydrophobicity, sebum participates to skin and fur protection. Accordingly, its depletion impairs water repulsion of fur and in the most severe cases, leads to hair break and loss in mice (Pappas, 2009). Of interest, several gene families involved in epidermis-derived lipid synthesis also participate to sebum synthesis. For example, deletion of *Elov3*, *Dgat1* and *CerS4* genes in mice compromises sebum secretion, resulting in progressive fur deterioration and hair loss (Chen et al., 2002; Ebel et al., 2014; Westerberg et al., 2004). In parallel, *Elov3* deletion was associated with skin permeability defect (Westerberg et al.,

2004), further suggesting combined roles of elongase family in synthesis of both sebaceous and epidermis-derived specific lipids.

Following elongation by ELOVL enzymes, VLCFA elongation cycle pursues with a second step of condensation by KAR enzyme, a third step of dehydration by HACD enzymes and a final step of condensation by TER enzyme (Sassa and Kihara, 2014). Contrarily to *Elovl1*, *Elovl3* and *Elovl4* genes which roles in skin lipid synthesis have been finely characterized (Kihara, 2016), involvement of *Hacd* genes in skin has not been assigned to date. *Hacd1* mutation leads to congenital myopathy in humans, dogs and mice and no skin defect has been reported in these conditions (Blondelle et al., 2015; Muhammad et al., 2013; Pelé et al., 2005) (Prola *et al.*, *accepted in Science Advances*). No mutation in *Hacd2* gene, its closest paralog (Ikeda et al., 2008), has been described so far, nor for *Hacd3* and *Hacd4* genes. We decided to explore the roles of *Hacd2* in mouse by using two different constructs that allowed the generation of both complete knockout (KO) or partial deficiency (knockdown, KD) of *Hacd2* expression. We demonstrated that total KO of *Hacd2* is embryonic lethal around E9.5, with a major defect in cardiovascular development (Khadhraoui *et al.*, *in preparation*). On the contrary, *Hacd2*-KD pups are born viable but undergo growth arrest and cachexia within three weeks. This devastating syndrome was linked to defective mitochondrial function in several vital organs (Khadhraoui *et al.*). In parallel, this condition was associated with ichthyosis and sebaceous gland atrophy that develop one to three days following growth arrest. Lipid analysis revealed changes in ceramide repartition and a shift towards more saturated fatty acids in major ceramides species. Our study thus identifies *Hacd2* as a new gene involved in skin lipid synthesis, which deficiency caused syndromic ichthyosis and sebaceous gland atrophy.

Results

***Hacd2* deficiency leads to skin alteration**

In order to analyze the roles of *Hacd2* during mouse development, we developed two genetic constructs; a knockout allele (*Hacd2*-KO) abolished *Hacd2* expression whereas a knockdown allele (*Hacd2*-flox) allowed residual expression of *Hacd2* wildtype mRNA (Figure 1A; Khadhraoui *et al.*). Heterozygous mice for each allele were viable and healthy but homozygosity for each allele was lethal, yet at different stages. *Hacd2*^{KO/KO} embryos died around E9.5 of embryonic development exhibiting severe cardiovascular malformation while *Hacd2*^{flox/flox} (hereafter *Hacd2*-KD) pups died in the first weeks after birth (Khadhraoui *et al.*). At birth, *Hacd2*-KD pups were often undistinguishable from their littermates although their body mass was slightly reduced (Khadhraoui *et al.*). However, at a variable stage between P5 and P22, they stopped growing and started to develop a few days later cachexia and lethargy, requiring euthanasia. In between, one to three days after growth arrest, their appearance changed, and skin alteration progressively developed on tail and hindlimbs (Figure 1B). On these extremities, skin became scaly and dry and within a couple of days, skin alteration worsened and extended to whole tail and hindlimbs. Eventually, tail tip necrotized in the most severe cases (Figure 1B). Among the 62 *Hacd2*-KD pups examined, only one survived beyond weaning and in addition to tail lesions, developed skin lesions on ears, with a thick skin, notches and scabs (Figure 1C).

Localized skin lesions of *Hacd2*-KD pups were not associated with dehydration, as shown by normal hematocrit and total serum protein content (Figure 1D-E).

Hacd2 gene is expressed in skin

Previous experiments reported early and broad expression of *Hacd2* gene, notably in skin (Khadhraoui *et al.*). We further analyzed *Hacd2* expression in skin in parallel to other *Hacd* genes. *Hacd2* gene was highly expressed compared to *Hacd3* and *Hacd4* genes, and expression of *Hacd1-fl* isoform, which encodes the functional HACD1 protein, was not observed (Figure 2A).

We previously show that *Hacd2*-flox allele gave rise to a residual expression of *Hacd2* wildtype mRNA, with marked tissue variation (Khadhraoui *et al.*). Quantification of *Hacd2* wildtype mRNA in skin revealed a 95% reduction in *Hacd2* expression in *Hacd2*-KD pups compared to their wildtype littermates (Figure 2B), indicating that in skin, *Hacd2*-flox allele was close to a null allele. Western blot analysis confirmed the absence of HACD2 expression in skin of *Hacd2*-KD pups (Figure 2C).

X-Gal staining on skin section allowed the visualization of *LacZ* reporter expression under the control of *Hacd2* promoter in *Hacd2*-flox or *Hacd2*-KO allele-bearing mice. Both alleles gave rise to similar observations. Macroscopically, skin sections presented a punctuate staining (Figure 2D) that histological examination allowed to unambiguously attribute to sebaceous glands (Figure 2E).

Hacd2 deficiency leads to ichthyosis and sebaceous gland atrophy

Histological analysis performed on tail of *Hacd2*-KD pups exhibiting ichthyosis revealed that stratum corneum was markedly thicker and more compact compared to littermates. To a lesser extent, stratum spinosum and stratum granulosum were also thicker in *Hacd2*-KD pups (Figure 3A). Such hyperkeratosis is a common compensatory sign of defective skin barrier

permeability (Elias et al., 2012; Vahlquist et al., 2018) and defines skin lesions of *Hacd2*-KD pups as ichthyosis.

In parallel, histological examination revealed a severe atrophy of sebaceous glands in *Hacd2*-KD pups, with a nearly complete loss of the foamy sebum content observed in sebocytes from control pups (Figure 3A). Transmitted electron microscopy revealed the presence of small sebocytes containing very few lipid droplets in their cytoplasm, (Figure 3B). Scanning electron microscopy performed on skin surface highlighted the scaly aspect of skin (Figure 3C). Moreover, compared to the straight and smooth hairs of control pups, *Hacd2*-KD pups displayed short and bent hairs with irregular contours, in accordance with sebaceous gland dysfunction.

***Hacd2* deficiency alters skin lipid content**

Lipidomic analysis of skin ceramides revealed that the unchanged total ceramide content was associated with an altered repartition of the different ceramide species. More precisely, ceramides containing the sphingosine or the dihydro-sphingosine long-chain base (LCB) (further called Cer and DHCer, respectively) were slightly increased, at the expense of the 6-hydroxy-sphingosine-containing ceramides (HexCer) in *Hacd2*-KD pups compared to controls (Figure 4A).

Relative repartition of species among each type revealed modified proportions in both major and minor species (Figure S1A-C) that seemed to point to the saturated versus unsaturated status of the FA chain linked to the LCB, rather to FA chain length or LCB species. Accordingly, repartition of LCB was not markedly modified in total ceramides albeit C18:0 LCB were slightly increased (Figure S2A) and repartition of ceramides FA chain length on either side of the C18 threshold was preserved (Figure S2B). On the contrary, the saturated versus unsaturated

status of ceramides FA was significantly modified, with an increase in saturated FA (SFA) and a decrease in unsaturated FA (MUFA) for Cer and HexCer, as well as a decrease in polyunsaturated FA (PUFA) for Cer (Figure 4B-D), leading to a global increase in SFA and decrease in both MUFA and PUFA in total ceramides (Figure 4E).

[Pending results for O-acyl-ceramide content]

Discussion

Our study demonstrated that *Hacd2* gene is involved in skin lipid synthesis and sebaceous gland function. Its deficiency led to progressive ichthyosis on hindlimbs and tail of mice within three weeks following birth. Ichthyosis was part of a syndromic condition comprising a multiorgan mitochondrial disease (Khadhraoui *et al.*). Ichthyosis apparition was shortly preceded by growth arrest and followed within a couple of days by lethal cachexia and lethargy. Characterization of *Hacd2* role in skin was thus serendipitously allowed by a specific genetic construct that preserved mice from death in a narrow temporal window during which consequences of *Hacd2* deficiency became visible in skin. In this knockdown genetic context, *Hacd2* expression was reduced, albeit at variable level among tissues. In particular, embryonic development was normal, contrarily to the complete knockout of *Hacd2* expression (Khadhraoui *et al.*). Of note, expression of *Hacd2* wildtype mRNA was nearly abolished in skin, likely providing a faithful, yet short-living model to study *Hacd2* role in skin lipid synthesis. Ichthyosis was characterized by thickening of stratum corneum, stratum spinosum and stratum granulosum. In parallel, sebaceous glands, which present a strong expression of *Hacd2*, were found atrophic and in accordance, hairs were bent and displayed irregular contours. These histological alterations were associated with modifications in lipid composition. In particular,

Cer and DHCer were increased at the expense of HexCer and ceramides FA were shifted towards more saturated species, leading to reduced content in MUFAs and PUFAs.

[To be completed.]

Three ELOVL proteins, namely ELOVL1, ELOVL3 and ELOVL4 have been implicated in skin lipid synthesis (Akiyama, 2017; Kihara, 2016). ELOVL1 and ELOVL4 proteins are required for ceramide synthesis and, hence, formation of functional skin permeability barrier (Agbaga et al., 2008; Cameron et al., 2007; Li et al., 2007; McMahon et al., 2007; Sassa et al., 2013; Vasireddy et al., 2007). Deficiency of each of them leads to death in the first hours following birth because of severe water loss. ELOVL3 deficiency is viable but provokes sebaceous gland dysfunction that results in progressive hair loss (Westerberg et al., 2004). Interestingly, increased, albeit limited, trans-epidermal water loss was also observed in *Elov3* deficient mice, suggesting a parallel involvement of *Elov3* in epidermis lipid synthesis (Westerberg et al., 2004). Overlap in both sebum and epidermis lipid synthesis is further observed within other gene families, such as Ceramide synthases (CERS) and Acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase (DGAT)-encoding genes, for which some members were shown to be involved in sebum synthesis while others are involved in epidermis-derived ceramide synthesis (Chen et al., 2002; Ebel et al., 2014; Jennemann et al., 2012; Stone et al., 2004). Of course, this overlap might be wider than reported since early death linked to severe defect in epidermis-derived lipids and thus skin permeability barrier may preclude observation of progressive sebaceous gland defect and associated fur alteration.

Complementarily to the first step of VLCFA synthesis in skin that involves *Elov1*, *Elov3* and *Elov4* elongases, our results demonstrate that *Hacd2* is required for the third step of the VLCFA elongation cycle in this tissue. On the contrary, *Hacd1* is reportedly not required for skin lipid synthesis (Blondelle et al., 2015; Muhammad et al., 2013; Pelé et al., 2005) (Prola et

al.) and deficient contexts for *Hacd3* or *Hacd4* genes have not been reported yet. The less severe phenotype observed in *Hacd2*-knockdown context compared to early lethality due to *Elov1* or *Elov4* deletion may suggest partial compensation by other *Hacd* genes. Alternatively, it could reflect that weak residual expression of *Hacd2* wildtype mRNA (5% compared to wildtype littermates) might be sufficient to avoid early lethality. This latter hypothesis would be in line with the fact that epidermis-restricted expression of *Elov4* rescues from early lethality although it only increases acylceramide content from 0.1 to 0.3 compared to wildtype (McMahon et al., 2011). This suggests that very low level of *Hacd2* expression in skin might also protect from severe ichthyosis and early lethality.

We previously demonstrated that *Hacd2* deficiency compromises mitochondrial function in liver, kidney and brown adipose tissue (Khadhraoui *et al.*). Mitochondrial disease was accompanied by hyperlactatemia that likely precipitated lethality. Although mitochondrial function could not be assessed in skin for technical limitations, defective mitochondrial ATP production following *Hacd2* deficiency, if present, would likely not participate to the observed skin phenotype since complete depletion in respiratory complex components does not perturb skin differentiation, indicating that skin mostly depends on anaerobic metabolism (Baris et al., 2011). Nevertheless, mitochondrial functions unrelated to ATP production are yet required in skin to avoid severe inflammation (Weiland et al., 2018). However, inflammation was not observed in skin sections from *Hacd2*-deficient pups, likely excluding mitochondrial dysfunction as causative for the observed skin phenotype. Nevertheless, decreased mitochondrial efficiency in skin might participate to hyperlactatemia and systemic deterioration of *Hacd2*-deficient pups.

Together, our results characterize *Hacd2* gene as an additional contributor to skin lipid synthesis and suggest that *Hacd2* mutations could be involved in syndromic ichthyosis accompanying mitochondrial diseases.

- EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS
- METHOD DETAILS
 - Measurement of total serum protein content and hematocrit
 - X-Gal staining of skin
 - Histological staining
 - Transmission electron microscopy
 - Scanning electron microscopy
 - Extraction of total RNA, and RT-qPCR analyses
 - Western blot experiments
 - Lipidomic analyses
- QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

EXPERIMENTAL MODEL AND SUBJECT DETAILS

Experiments on mice were approved by the Anses/EnvA/Upec Ethics Committee (C2EA – 16; approval number 20/12/12-17 and 17-031) and all care and manipulations were performed in accordance with national and European legislation on animal experimentation. The whole study was carried on animals that were housed in stainless steel cages containing environmental enrichment, in rooms maintained at 22 ± 1 °C with an air change rate of 12 vol/h and lit from 7am to 7pm. Food and water were given *ad libitum*. *Hacd2*-knockout (*Hacd2*-KO) and *Hacd2*-knockdown (*Hacd2*-KD; *Hacd2*^{flox/flox}) mice were generated as previously described (Khadhraoui *et al.*). Food was breeding diet for rats and mice (C1314, Altronim) for pregnant and lactating females or maintenance diet (C1324, Altronim) for weaned animals. Animals were euthanized by head section for pups up to 3 weeks and by cervical dislocation for animals older than 3 weeks, in accordance with the principles of good laboratory animal practice.

METHODS DETAILS

Measurement of total serum protein content and hematocrit

Blood was collected at the head section site from *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (ranging from P5 to P26) and their control littermates. For total serum protein content, blood was collected in an Eppendorf vial, incubated for 30 min at room temperature (RT) and centrifuged at 1000g for 10 min. BCA protein assay reagent kit (Pierce) was used to measure the amount of total proteins in the serum. For hematocrit calculation, blood was collected in a capillary tube and centrifuged of 2000g for 10 min. The ratio of the capillary length containing blood cells to the total blood length indicated the hematocrit.

X-Gal staining of skin

A piece of skin was cut from the most caudal part of the back of *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (P14) and their WT littermates, or from WT and *Hacd2*^{+/*KO*} mice (3 months of age). It was fixed in formol for 30 min and rinsed in PBS. Samples were protected from light and immersed overnight at 33°C in a X-Gal solution (4mM potassium ferrocyanide, 4mM potassium ferricyanide, 2mM MgCl₂, 1% *sodium deoxycholate*, 1% Nonidet P40, 4% 5-Bromo-4-chloro-3-india-BD-Galactopyranoside (X-Gal) in PBS). The next day, the samples were rinsed in PBS and observed using a Nikon SMZ1500 stereomicroscope. Images were acquired using NIS (Nikon) software.

Histological staining

X-Gal stained tissues from *Hacd2*^{KO/+} and WT animals or formol-fixed tail pieces from *Hacd2*-KD and WT mice were processed for paraffin inclusion, section and

hematoxylin-eosin staining. Images were captured using an Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) and analyzed using the ImageJ software (v1.47, NIH).

Transmission electron microscopy

After euthanasia of *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (P14) and their WT littermates, tails were cut transversally in small pieces and fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 overnight at 4°C. Samples were contrasted with Oolong Tea Extract 0.5% in cacodylate buffer, postfixed with a solution of 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium cyanoferrate, then gradually dehydrated in ethanol (30% to 100%) and substituted gradually in a mix of propylene oxide-epon and embedded in Epon (Delta microscopy). Thin sections (70 nm) were collected onto 200 mesh copper grids and counterstained with lead citrate. Grids were examined with a Hitachi HT7700 electron microscope operating at 80 kV (Elexience). Images were acquired with a charge-coupled device camera (AMT).

Scanning electron microscopy

After euthanasia of *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (P14) and their WT littermates, tails were cut transversally in small pieces and fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer, pH 7.2 overnight at 4°C. Postfixation was performed by immersing the surfaces in a solution of 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium cyanoferrate for 1h at 4°C in the dark. The samples were then placed in ethanol baths of increasing concentration (70, 90, 95 and 100%) at a rate of three baths of 10 min per concentration, dried to critical point with CO₂ and coated with gold-palladium in an automatic sputter. High-magnification imaging was performed at an operating voltage of 2kV under a S-4500 Hitachi FESEM.

Extraction of total RNA, and RT-qPCR analyses

Skin samples from WT mice (3 months of age) or *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (P9) and their WT littermates were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C. Total RNAs were isolated using TRIzol reagent (Sigma) according to the manufacturer's protocol. Purity of RNAs was assessed by a ratio of absorbance at 260 nm to 230 nm > 1.8. RNA quality was checked on agarose gel. 200ng (Figure 2A) and 500ng (Figure 2B) of RNA were used for reverse transcription with the Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR (Fermentas). cDNAs were amplified using the Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (Fermentas). qPCR reactions were performed on a Roche Light Cycler system (Roche). All qPCR products were examined qualitatively on agarose gels. All presented RT-qPCR results were normalized to β -*actin* or *Rpl32* housekeeping genes expression. Primer sequences are available in Table S1.

Western blot experiments

Frozen skin samples from *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (P10) and their WT littermates were lysed in lysis buffer (300 mM KCl, 30 mM PIPES pH6.6, 10 mM Na-Butyrate, 0.5% IGEPAL), supplemented with protease and phosphatase inhibitor cocktail (Pierce), and homogenised in Bertin homogenizer (3 cycles x 20 seconds). The samples were sonicated for 10 seconds and centrifuged at 15,000g for 10 min at 4°C. The supernatants were transferred into a new vial and protein content was measured using a BCA quantification kit (ThermoFisher Scientific). 10 µg of proteins were mixed with blue loading dye 5X (Tris-HCl 300 mM, SDS 500 mM, 100mM DTT, glycerol 50%, and a pinch of bromophenol blue) and incubated for 1h at RT. The samples were then incubated with 50 mM of iodoacetamide for 1h at RT in the dark.

Samples were then loaded on Bolt™ 4-12% Bis-Tris gels (Invitrogen), separated for 22 min at 200 V and subsequently transferred on PVDF membrane using transfer stack and iblot2 system for 7 min at 20 V (Invitrogen). Blots were blocked for 1h in 5% BSA, 0.1% Tween20 in TBS pH 7.4 (20 mM Tris, 150 mM NaCl) at RT and then incubated with primary antibodies (anti-HACD2 (Biorbyt) or Anti-beta-tubulin (Santa Cruz), 1:1000) overnight at 4°C in TBS-Tween. After three washings of 10 min in TBS-Tween, blots were incubated with a HRP-conjugated anti-rabbit antibody for 1h at RT and revealed using the West Femto chemiluminescent substrate (Pierce). Light emission was recorded using a chemiluminescent detection system (G-Box, Syngene) and quantified by the ImageJ software (v1.47, NIH).

Lipidomic analyses

After euthanasia of *Hacd2*-KD mice at a terminal stage (P6 to P10) and their WT littermates, tiny pieces of tail skin were removed, protected from oxidation by argon gas-replacement and stored at -80°C until analysis.

Targeted quantitation of ceramides dihydroceramides and hexosylceramides by LCMS² was performed as follows. Lipids were extracted according to the method of Bligh and Dyer (Reis et al., 2013). Briefly, tail homogenates (3 mg in 150 µl saline) were mixed with 500 ng of d18:1-12:0 Cer (Avanti Polar Lipids, Coger SAS, Paris, France), used as internal standard, and extracted with 750 µL of chloroform/methanol 2/1 for 10 min. Chloroform (250 µL) was then added and extraction followed for 10 min. Distilled water (250 µL) was added and extraction continued for 10 more min. After centrifugation (10000g, 10 min, 4°C) the organic phase was collected. The aqueous phase was acidified with hydrochloric acid (8 µL, 3 mol/L) and further extracted with

chloroform (600 μ L) for 10 min. After centrifugation (10000g, 10 min, 4°C) the organic phase was collected and combined to the previous one.

Pooled organic phases were washed with 800 μ L of authentic upper phase of Chloroform/Methanol/distilled water (96.7/93.3/90). Organic phase was evaporated under vacuum. Extracts were finally dissolved with 100 μ L of Chloroform/Methanol/distilled water 60/30/4.5 and 2 μ L were injected on a 1200 6460-QqQ LC-MS/MS system equipped with an ESI source (Agilent technologies). Separation was achieved on a Zorbax Eclipse C8 2.1x100 mm, 1.8 μ m column (Agilent technologies) at a flow rate of 0,3 ml/min, 50°C, with a linear gradient of (solvent A) formic acid/ammonium formate (0,2% /1mM final concentrations) and (solvent B) methanol containing formic acid/ammonium formate 1mM as follows : 85% B for 1 min, up to 100% B in 8 min, and maintained at 100 % for 4 min. Acquisition was performed in positive Single Reaction Monitoring (SRM) mode (source temperature : 325°C, nebulizer gas flow rate was 10 L/min, sheath gas flow 11 L/min, temperature 350°C, capillary 3500 V, VCharging 600 V). Fragmentor voltage and collision energy voltage were set up as follows: 140/40, 130/30, 150/25 and 115/20 for lactosyl-ceramides, hexosyl-ceramides, dihydro-ceramides and ceramides respectively. Transitions used for quantitation of d18:2-, d18:1- and d18:0- long chain base containing molecules were [M-18] $^{+}$ \rightarrow 262.2, [M-18] $^{+}$ \rightarrow 264.2 and [M-18] $^{+}$ \rightarrow 266.2, respectively.

Relative quantitation of ceramide related compounds was performed by calculating the response ratio of the considered ceramide to d18:1/12:0 Ceramide, used as internal standard.

Chemicals of the highest grade available were purchased from Sigma Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). LCMSMS quality grade solvents were purchased from Fischer Scientific (Illkirch, France).

QUANTIFICATION AND STATISTICAL ANALYSIS

All data are presented as mean \pm s.e.m.. Data were analyzed using GraphPad Prism. Differences were evaluated using a two-tailed unpaired non-parametric Mann-Whitney test with 95% confidence. Multiple pair wise tests were corrected using Holm-Bonferroni method. Differences between groups were considered significant when P value was less than 0.05. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$.

References

- Agbaga, M.-P., Brush, R.S., Mandal, M.N.A., Henry, K., Elliott, M.H., and Anderson, R.E. (2008). Role of Stargardt-3 macular dystrophy protein (ELOVL4) in the biosynthesis of very long chain fatty acids. *PNAS* *105*, 12843–12848.
- Akiyama, M. (2017). Corneocyte lipid envelope (CLE), the key structure for skin barrier function and ichthyosis pathogenesis. *Journal of Dermatological Science* *88*, 3–9.
- Baris, O.R., Klose, A., Kloepper, J.E., Weiland, D., Neuhaus, J.F.G., Schauen, M., Wille, A., Müller, A., Merkwirth, C., Langer, T., et al. (2011). The mitochondrial electron transport chain is dispensable for proliferation and differentiation of epidermal progenitor cells. *Stem Cells* *29*, 1459–1468.
- Blondelle, J., Ohno, Y., Gache, V., Guyot, S., Storck, S., Blanchard-Gutton, N., Barthélémy, I., Walmsley, G., Rahier, A., Gadin, S., et al. (2015). HACD1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *J Mol Cell Biol* *7*, 429–440.
- Breiden, B., and Sandhoff, K. (2014). The role of sphingolipid metabolism in cutaneous permeability barrier formation. *Biochim. Biophys. Acta* *1841*, 441–452.
- Cameron, D.J., Tong, Z., Yang, Z., Kaminoh, J., Kamiyah, S., Chen, H., Zeng, J., Chen, Y., Luo, L., and Zhang, K. (2007). Essential role of Elovl4 in very long chain fatty acid synthesis, skin permeability barrier function, and neonatal survival. *Int. J. Biol. Sci.* *111*–119.
- Chen, H.C., Smith, S.J., Tow, B., Elias, P.M., and Farese, R.V. (2002). Leptin modulates the effects of acyl CoA:diacylglycerol acyltransferase deficiency on murine fur and sebaceous glands. *J Clin Invest* *109*, 175–181.
- Ebel, P., Imgrund, S., Vom Dorp, K., Hofmann, K., Maier, H., Drake, H., Degen, J., Dörmann, P., Eckhardt, M., Franz, T., et al. (2014). Ceramide synthase 4 deficiency in mice causes lipid alterations in sebum and results in alopecia. *Biochem J* *461*, 147–158.
- Elias, P.M., Williams, M.L., and Feingold, K.R. (2012). Abnormal barrier function in the pathogenesis of ichthyosis: Therapeutic implications for lipid metabolic disorders. *Clinics in Dermatology* *30*, 311–322.
- Grond, S., Eichmann, T.O., Dubrac, S., Kolb, D., Schmuth, M., Fischer, J., Crumrine, D., Elias, P.M., Haemmerle, G., Zechner, R., et al. (2017). PNPLA1 Deficiency in Mice and Humans Leads to a Defect in the Synthesis of Omega-O-Acylceramides. *Journal of Investigative Dermatology* *137*, 394–402.
- Holland, W.L., Brozinick, J.T., Wang, L.-P., Hawkins, E.D., Sargent, K.M., Liu, Y., Narra, K., Hoehn, K.L., Knotts, T.A., Siesky, A., et al. (2007). Inhibition of Ceramide Synthesis Ameliorates Glucocorticoid-, Saturated-Fat-, and Obesity-Induced Insulin Resistance. *Cell Metabolism* *5*, 167–179.
- Ikeda, M., Kanao, Y., Yamanaka, M., Sakuraba, H., Mizutani, Y., Igarashi, Y., and Kihara, A. (2008). Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very

long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Letters* 582, 2435–2440.

Jennemann, R., Rabionet, M., Gorgas, K., Epstein, S., Dalpke, A., Rothermel, U., Bayerle, A., van der Hoeven, F., Imgrund, S., Kirsch, J., et al. (2012). Loss of ceramide synthase 3 causes lethal skin barrier disruption. *Hum Mol Genet* 21, 586–608.

Kendall, A.C., Kiezel-Tsugunova, M., Brownbridge, L.C., Harwood, J.L., and Nicolaou, A. (2017). Lipid functions in skin: Differential effects of n-3 polyunsaturated fatty acids on cutaneous ceramides, in a human skin organ culture model. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1859, 1679–1689.

Kihara, A. (2016). Synthesis and degradation pathways, functions, and pathology of ceramides and epidermal acylceramides. *Progress in Lipid Research* 63, 50–69.

Li, W., Sandhoff, R., Kono, M., Zerfas, P., Hoffmann, V., Ding, B.C.-H., Proia, R.L., and Deng, C.-X. (2007). Depletion of ceramides with very long chain fatty acids causes defective skin permeability barrier function, and neonatal lethality in ELOVL4 deficient mice. *Int. J. Biol. Sci.* 120–128.

McMahon, A., Butovich, I.A., Mata, N.L., Klein, M., Ritter, R., Richardson, J., Birch, D.G., Edwards, A.O., and Kedzierski, W. (2007). Retinal pathology and skin barrier defect in mice carrying a Stargardt disease-3 mutation in elongase of very long chain fatty acids-4. *Mol Vis* 13, 258–272.

McMahon, A., Butovich, I.A., and Kedzierski, W. (2011). Epidermal expression of an Elov14 transgene rescues neonatal lethality of homozygous Stargardt disease-3 mice. *J. Lipid Res.* 52, 1128–1138.

Muhammad, E., Reish, O., Ohno, Y., Scheetz, T., Deluca, A., Searby, C., Regev, M., Benyamini, L., Fellig, Y., Kihara, A., et al. (2013). Congenital myopathy is caused by mutation of HACD1. *Hum. Mol. Genet.* 22, 5229–5236.

Ohno, Y., Suto, S., Yamanaka, M., Mizutani, Y., Mitsutake, S., Igarashi, Y., Sassa, T., and Kihara, A. (2010). ELOVL1 production of C24 acyl-CoAs is linked to C24 sphingolipid synthesis. *PNAS* 107, 18439–18444.

Ohno, Y., Nakamichi, S., Ohkuni, A., Kamiyama, N., Naoe, A., Tsujimura, H., Yokose, U., Sugiura, K., Ishikawa, J., Akiyama, M., et al. (2015). Essential role of the cytochrome P450 CYP4F22 in the production of acylceramide, the key lipid for skin permeability barrier formation. *PNAS* 112, 7707–7712.

Pappas, A. (2009). Epidermal surface lipids. *Dermatoendocrinol* 1, 72–76.

Pelé, M., Tiret, L., Kessler, J.-L., Blot, S., and Panthier, J.-J. (2005). SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1417–1427.

Prola, A., Blondelle, J., Vandestienne, A., Piquereau, J., Denis, R.G., Guyot, S., Chauvin, H., Mourier, A., Maurer, M., Henry, C., Khadhraoui, N., Gallerne, C., Molinié, T., Courtin, G., Guillaud, L., Gressette, M., Solgadi, A., Dumont, F., Castel, J., Ternacle, J., Demarquoy, J., Malgoyre, A., Koulmann, N., Derumeaux, G., Giraud, M.-F., Joubert, F., Veksler, V., Luquet, S., Relaix, F., Tiret, L., **Pilot-Storck, F.** Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle (*Science Advances*, *in press*)

Reis, A., Rudnitskaya, A., Blackburn, G.J., Fauzi, N.M., Pitt, A.R., and Spickett, C.M. (2013). A comparison of five lipid extraction solvent systems for lipidomic studies of human LDL. *J. Lipid Res.* *54*, 1812–1824.

Sassa, T., and Kihara, A. (2014). Metabolism of very long-chain Fatty acids: genes and pathophysiology. *Biomol Ther (Seoul)* *22*, 83–92.

Sassa, T., Ohno, Y., Suzuki, S., Nomura, T., Nishioka, C., Kashiwagi, T., Hirayama, T., Akiyama, M., Taguchi, R., Shimizu, H., et al. (2013). Impaired epidermal permeability barrier in mice lacking *elovl1*, the gene responsible for very-long-chain fatty acid production. *Mol Cell Biol* *33*, 2787–2796.

Stone, S.J., Myers, H.M., Watkins, S.M., Brown, B.E., Feingold, K.R., Elias, P.M., and Farese, R.V. (2004). Lipopenia and skin barrier abnormalities in DGAT2-deficient mice. *J Biol Chem* *279*, 11767–11776.

Uchida, Y., and Holleran, W.M. (2008). Omega-O-acylceramide, a lipid essential for mammalian survival. *Journal of Dermatological Science* *51*, 77–87.

Vahlquist, A., Fischer, J., and Törmä, H. (2018). Inherited Nonsyndromic Ichthyoses: An Update on Pathophysiology, Diagnosis and Treatment. *Am J Clin Dermatol* *19*, 51–66.

Vasireddy, V., Uchida, Y., Salem, N., Kim, S.Y., Mandal, M.N.A., Reddy, G.B., Bodepudi, R., Alderson, N.L., Brown, J.C., Hama, H., et al. (2007). Loss of functional ELOVL4 depletes very long-chain fatty acids ($\geq C28$) and the unique ω -O-acylceramides in skin leading to neonatal death. *Hum Mol Genet* *16*, 471–482.

Weiland, D., Brachvogel, B., Hornig-Do, H.-T., Neuhaus, J.F.G., Holzer, T., Tobin, D.J., Niessen, C.M., Wiesner, R.J., and Baris, O.R. (2018). Imbalance of Mitochondrial Respiratory Chain Complexes in the Epidermis Induces Severe Skin Inflammation. *Journal of Investigative Dermatology* *138*, 132–140.

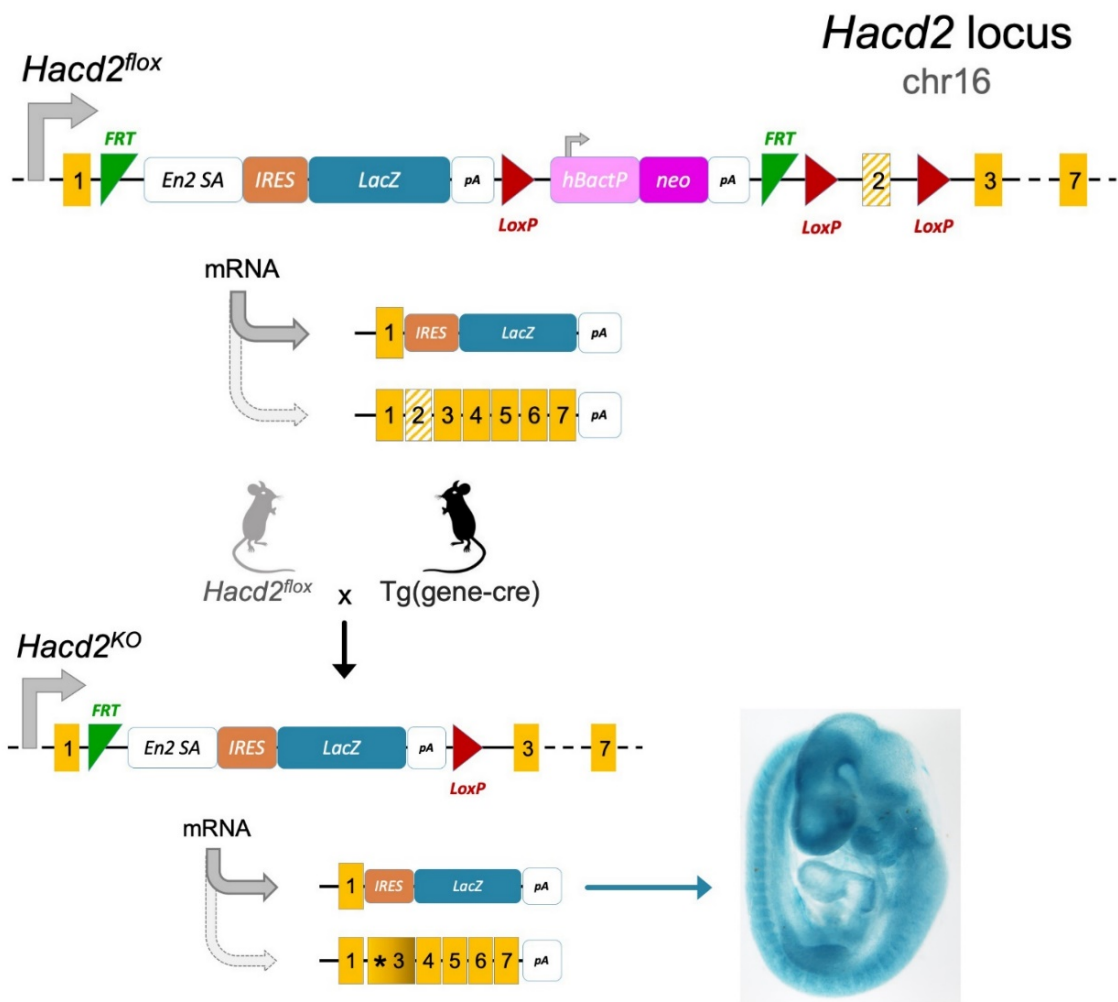
Westerberg, R., Tvrdik, P., Undén, A.-B., Månsson, J.-E., Norlén, L., Jakobsson, A., Holleran, W.H., Elias, P.M., Asadi, A., Flodby, P., et al. (2004). Role for ELOVL3 and Fatty Acid Chain Length in Development of Hair and Skin Function. *J. Biol. Chem.* *279*, 5621–5629.

Acknowledgments

The authors are grateful to Camille Laisne and Diana Gelperowic for taking care of mice; Jean-Paul Pais de Barros and the LAP platform (Dijon, France) for lipidomic analyses; Christine Longin and Martine Letheule for transmission electron microscopy and Thierry Meylheuc for scanning electron microscopy (Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods MIMA2 platform, INRAE, Jouy-en-Josas, France); Karine Reynaud for providing reagents and Sophie Chateau for technical help in histological analyses.

N.K.'s PhD fellowship has been financially supported by the French "Fondation pour la Recherche Médicale" (FRM). The work was primarily supported by the French "Agence Nationale de la Recherche" (ANR-12-JSV1-0005) and the "Association Française contre les Myopathies" (AFM 16143 and Translamuscle). The authors declare that they have no conflict of interest.

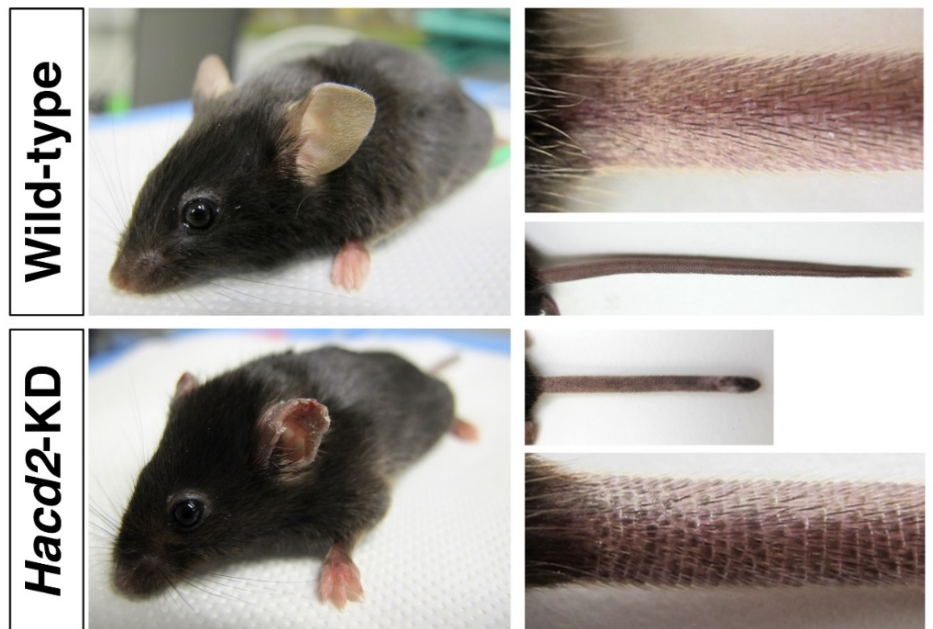
A



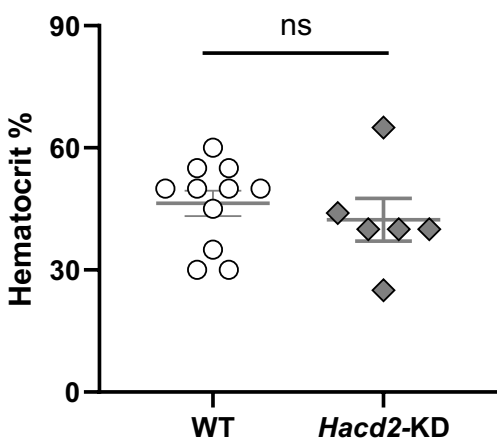
B



C



D



E

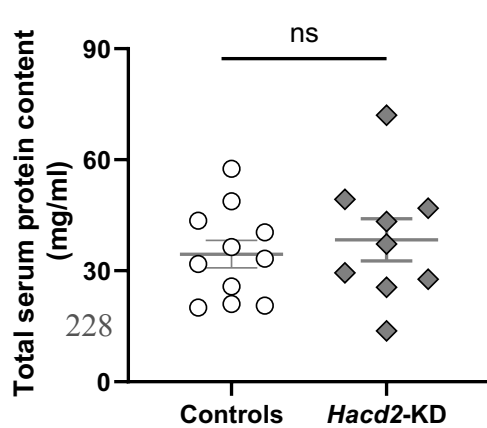


Figure 1

Figure 1 | *Hacd2* knockdown provokes skin alteration in early postnatal life.

(A) Structures of *Hacd2* targeting constructs. *Hacd2* targeting vector was inserted by homologous recombination and comprised a *LacZ* reporter gene and FRT and LoxP recombination sites (upper part). The resulting *Hacd2*-flox allele gives rise to the expression of the *LacZ* reporter construct, along with residual *Hacd2* wildtype mRNA. Recombination by a ubiquitous Cre recombinase generated *Hacd2*-KO allele (lower part), which gives rise to the expression of the *LacZ* reporter construct, along with a mutant *Hacd2* mRNA that presents an early stop codon. In both cases, the strong splicing acceptor of *En2* gene (*En2SA*) favours transcription of *LacZ* mRNA over *Hacd2* transcript. IRES: Internal Ribosome Entry Site; pA: polyadenylation site; FRT: recombination site for flippase recombinase; LoxP: recombination site for Cre recombinase; hBactP: promoter of the human *beta-actin* gene; neo: resistance gene to neomycin. **(B)** Representative photograph of a *Hacd2*-KD pup at P14 compared to wildtype (WT) littermate. Note the scaly and dry skin of *Hacd2*-KD pup on tail and hindlimb. Spontaneous scab is visible at tail tip. **(C)** Photograph of a unique *Hacd2*-KD mouse that survived beyond weaning (here, 3-month old), compared to WT littermate. Serous deposits are visible on ear contours and progressive necrosis of tail was responsible for the observed shortening of tail. Scaly aspect of tail is clearly visible. **(D-E)** Dehydration level was evaluated by measurement of hematocrit (D) and total serum protein content (E) in *Hacd2*-KD mice at terminal stage, and control littermates.

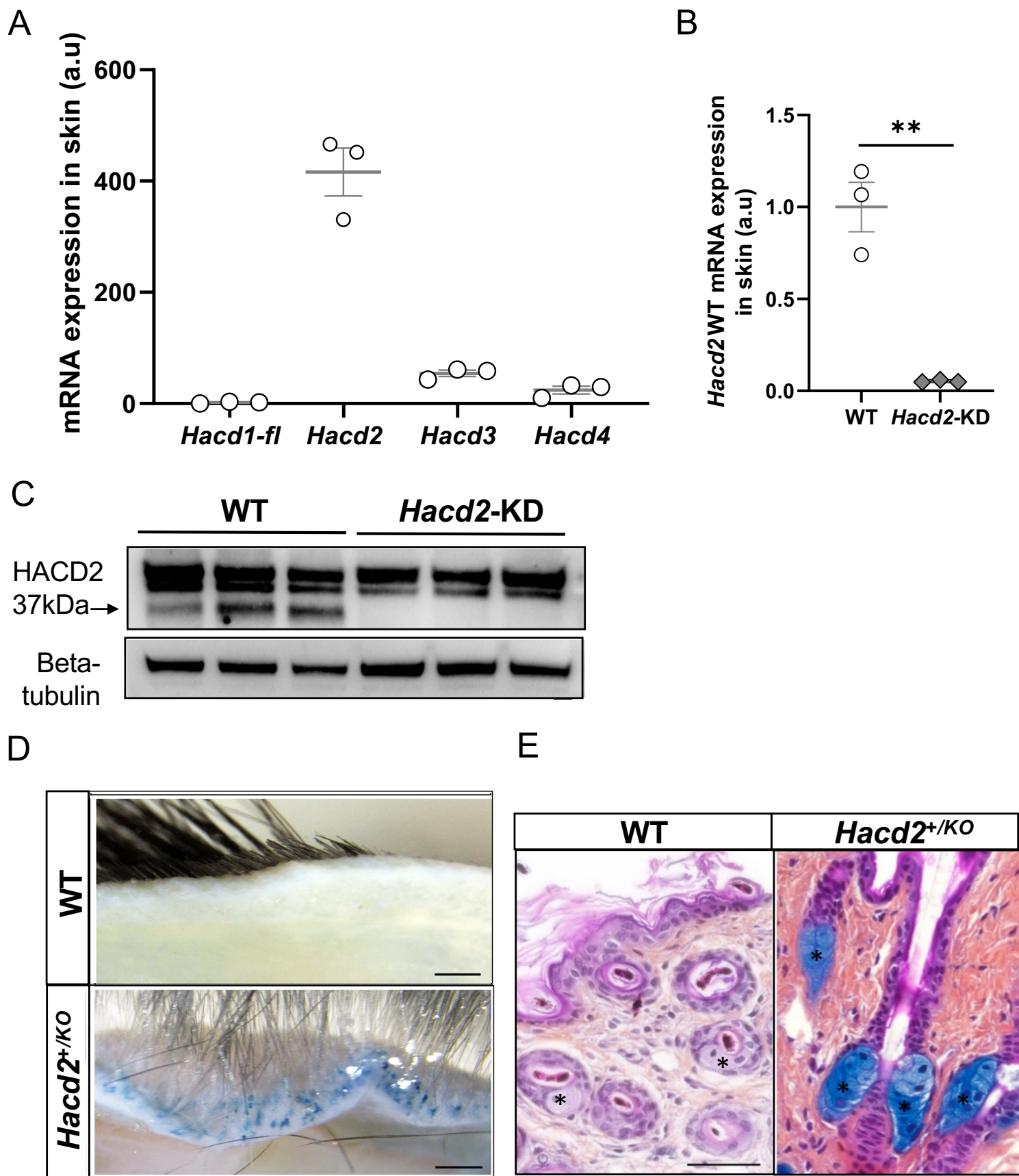


Figure 2 | *Hacd2* expression in skin.

(A) mRNA expression of *Hacd2* gene and paralogs in skin of WT mice, normalized to β -actin mRNA. Comparison of the different gene expression was done after correction on qPCR efficiency. *Hacd1*-fl mRNA encodes HACD1 active isoform. **(B)** Expression of *Hacd2* wildtype mRNA was assessed in skin from *Hacd2*-KD and WT littermates and normalized to Rpl32 mRNA. **(C)** Western blot analysis of HACD2 expression in skin from *Hacd2*-KD and WT littermates. Note the absence of a band at the expected size for HACD2 protein in *Hacd2*-KD samples. **(D-E)** X-Gal staining of skin macroscopically revealed a punctate staining in *Hacd2*^{KO/+} mice (scale bar: 500 μ m) (D) that corresponded on histological sections counter-stained by hematoxylin and eosin to a strong staining of sebaceous glands (scale bar: 50 μ m) (E). **, $P < 0.01$.

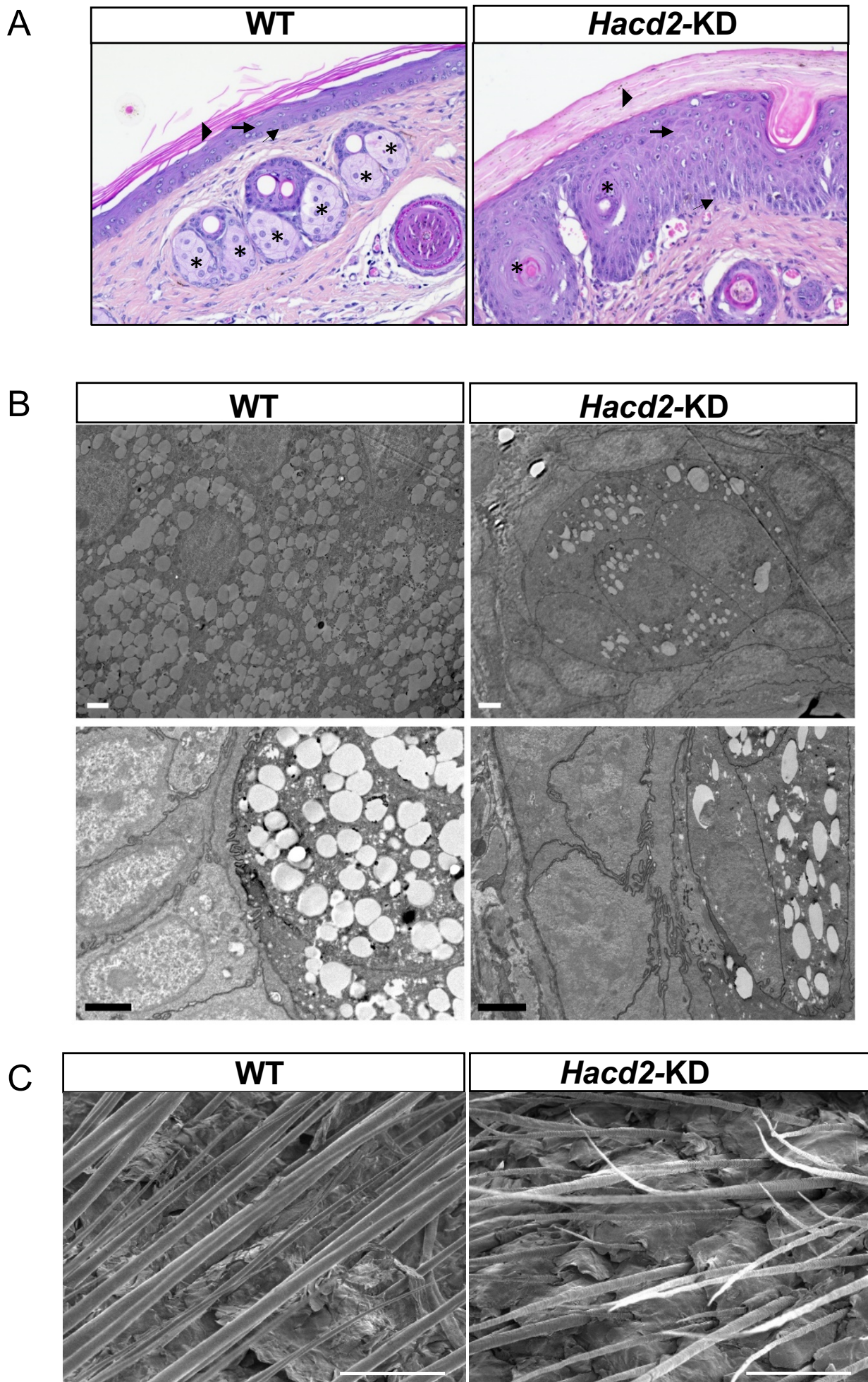


Figure 3 | Ichthyosis and sebaceous gland atrophy of skin from *Hacd2*-KD mice.

(A) Tail skin sections from *Hacd2*-KD and WT littermates at P14 stained with hematoxylin and eosin in optic microscopy, showing thicker and more condensed stratum corneum (arrow head) and stratum granulosum (bold arrow), increased number of cell layers in the stratum spinosum (arrow) and atrophy of sebaceous glands (asterisks) on *Hacd2*-KD section (magnification: 20X). **(B)** Transmission electron microscopy on skin show reduced lipid content and reduced size of sebaceous cells in *Hacd2*-KD compared to WT skin sections. **(C)** Scanning electron microscopy on skin surface reveals scaly epidermis, with a dense sheath of cornified cells around emerging hairs in *Hacd2*-KD, compared to WT. Note the short and bent hairs with irregular contours in *Hacd2*-KD, compared WT.

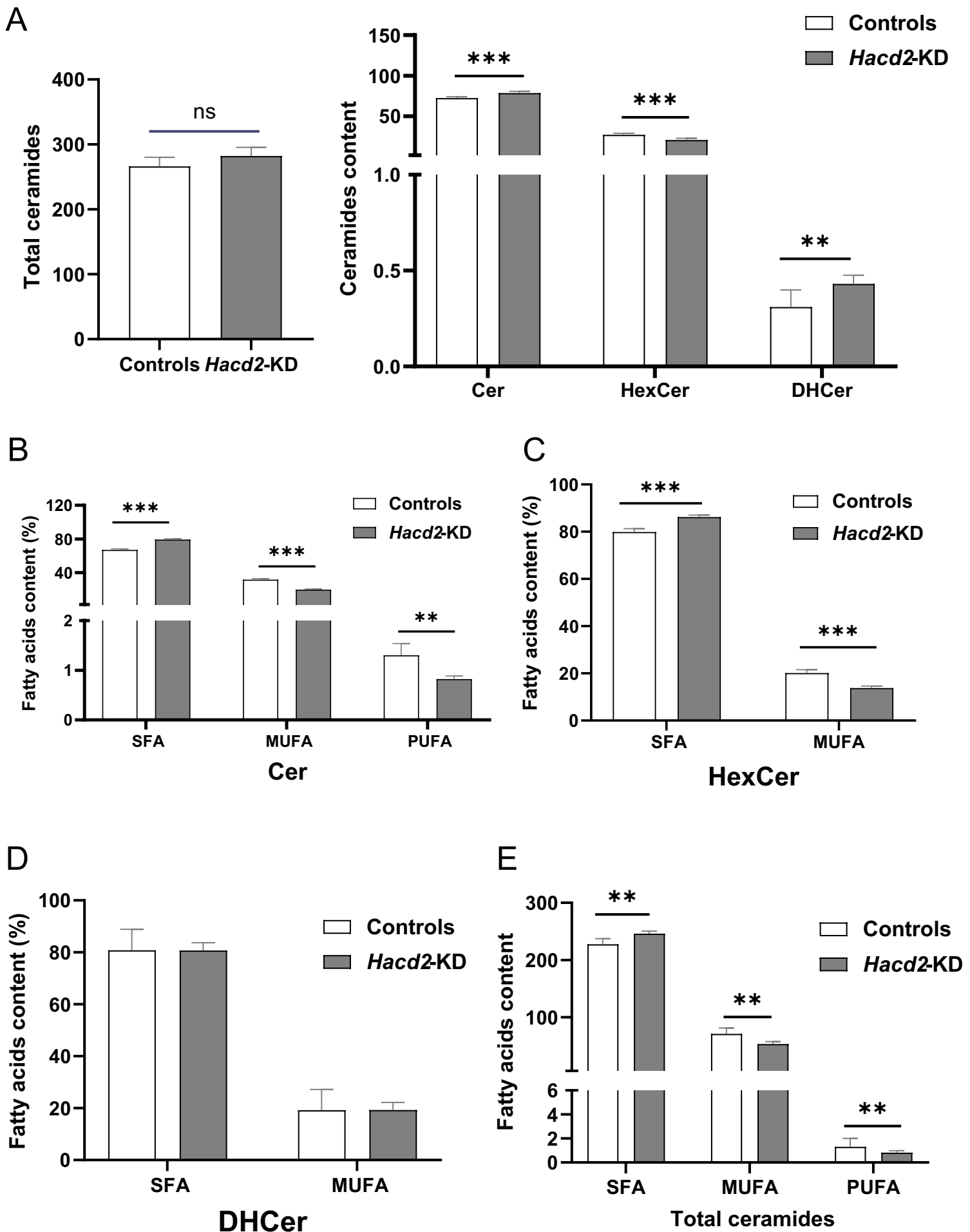


Figure 4 | Ceramide analysis in *Hacd2*-KD skin

(A) Absolute content of sphingosine-containing ceramides (Cer), 6-hydroxy-sphingosine-containing ceramides (HexCer), dihydro-sphingosine-containing ceramides (DHCer) and total ceramides in skin of *Hacd2*-KD versus control mice (pmol/mg). **(B-E)** Relative content of saturated (SFA), monounsaturated (MUFA) and polyunsaturated (PUFA) fatty acids in Cer **(B)**, HexCer **(C)**, DHCer **(D)** and total ceramides **(E)** in skin of *Hacd2*-KD versus control mice. n=7 *Hacd2*-KD and n= 9 control mice; **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$.

Supplementary Figures and Tables

Figure S1 | Relative content of ceramides in *Hacd2*-KD skin

(A-C) Relative content of Cer (A), HexCer (B) and DHCer (C) species in skin of *Hacd2*-KD versus control mice. n=7 *Hacd2*-KD and n= 9 control mice; *, $P<0.05$, **, $P<0.01$, ***, $P<0.001$.

Figure S2 | Ceramide repartition in *Hacd2*-KD skin

(A-B) Relative content of total ceramide species depending on their long chain base (LCB) **(A)** or on the length of their fatty acid **(B)** in skin of *Hacd2*-KD versus control mice. n=7 *Hacd2*-KD and n= 9 control mice; **, $P<0.01$.

Table S1 | Sequence of qPCR primers.

Related to Materials and methods.

Hacd2-12F and -34R pair was used to quantify residual WT *Hacd2* mRNA in *Hacd2*-KD skin and *Hacd2*-34F and -5R pair to quantify total *Hacd2* mRNA in WT mice.

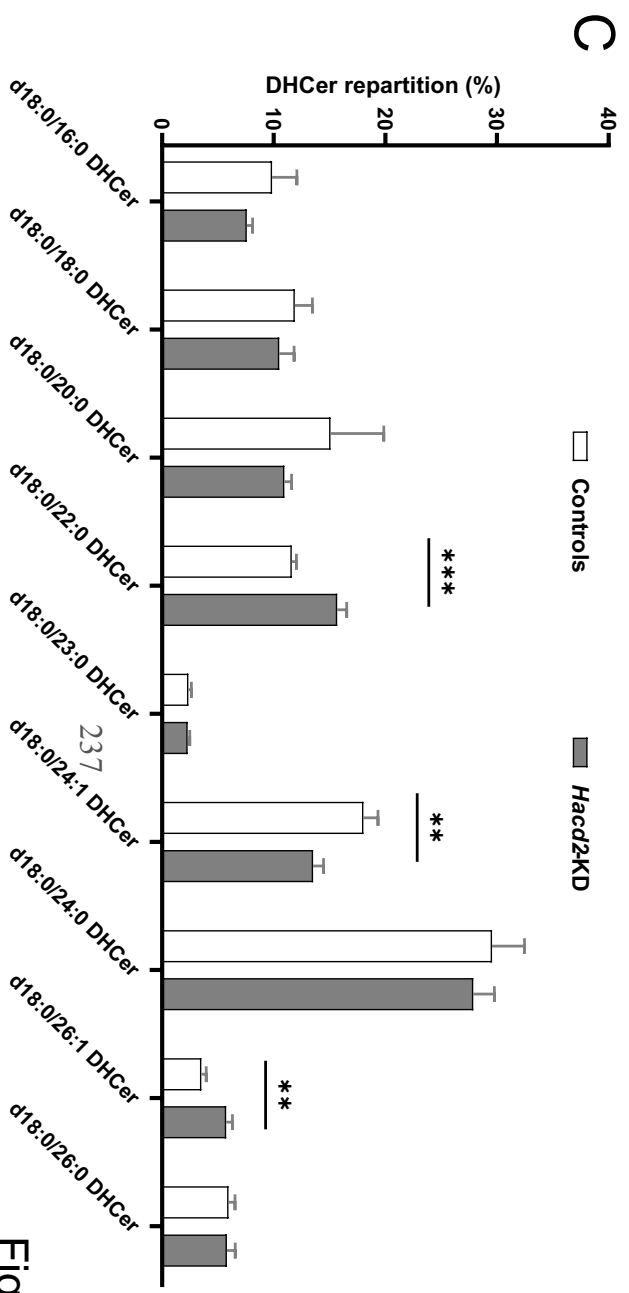
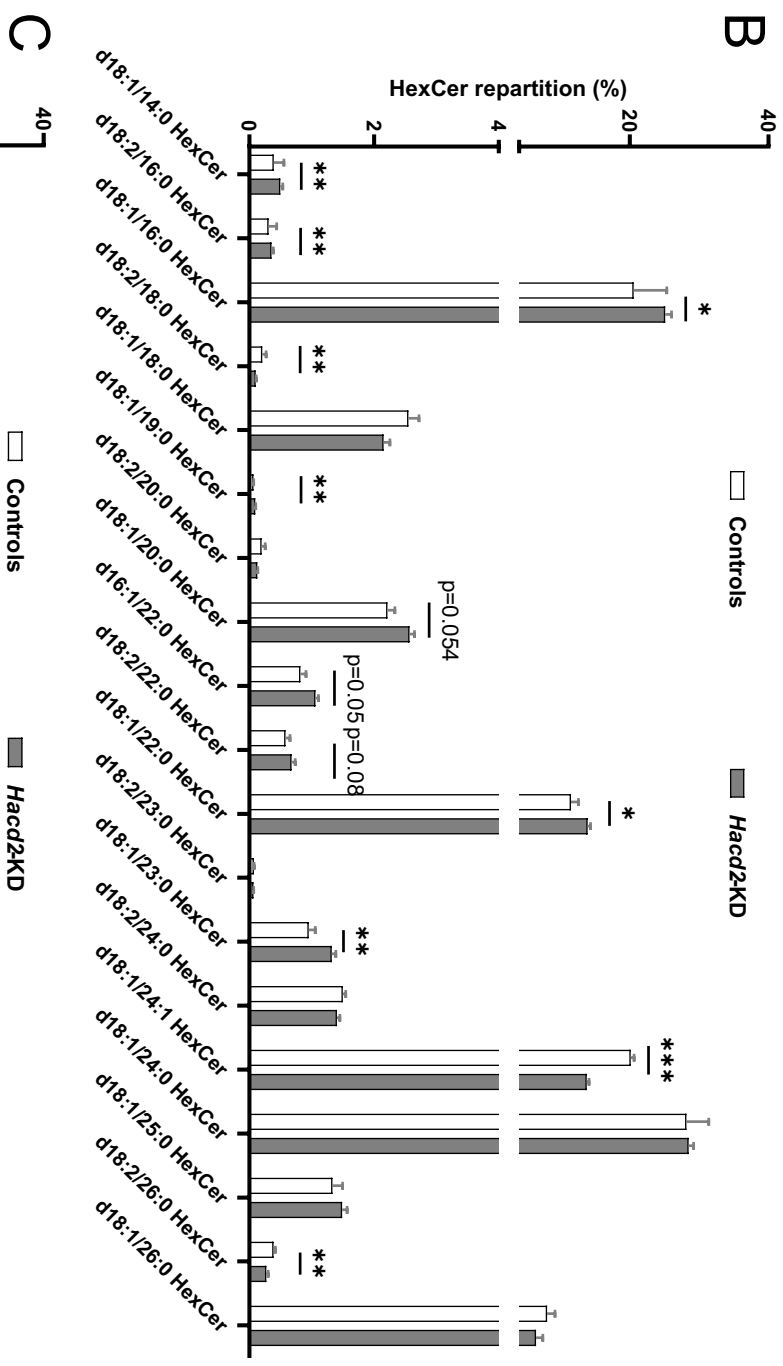
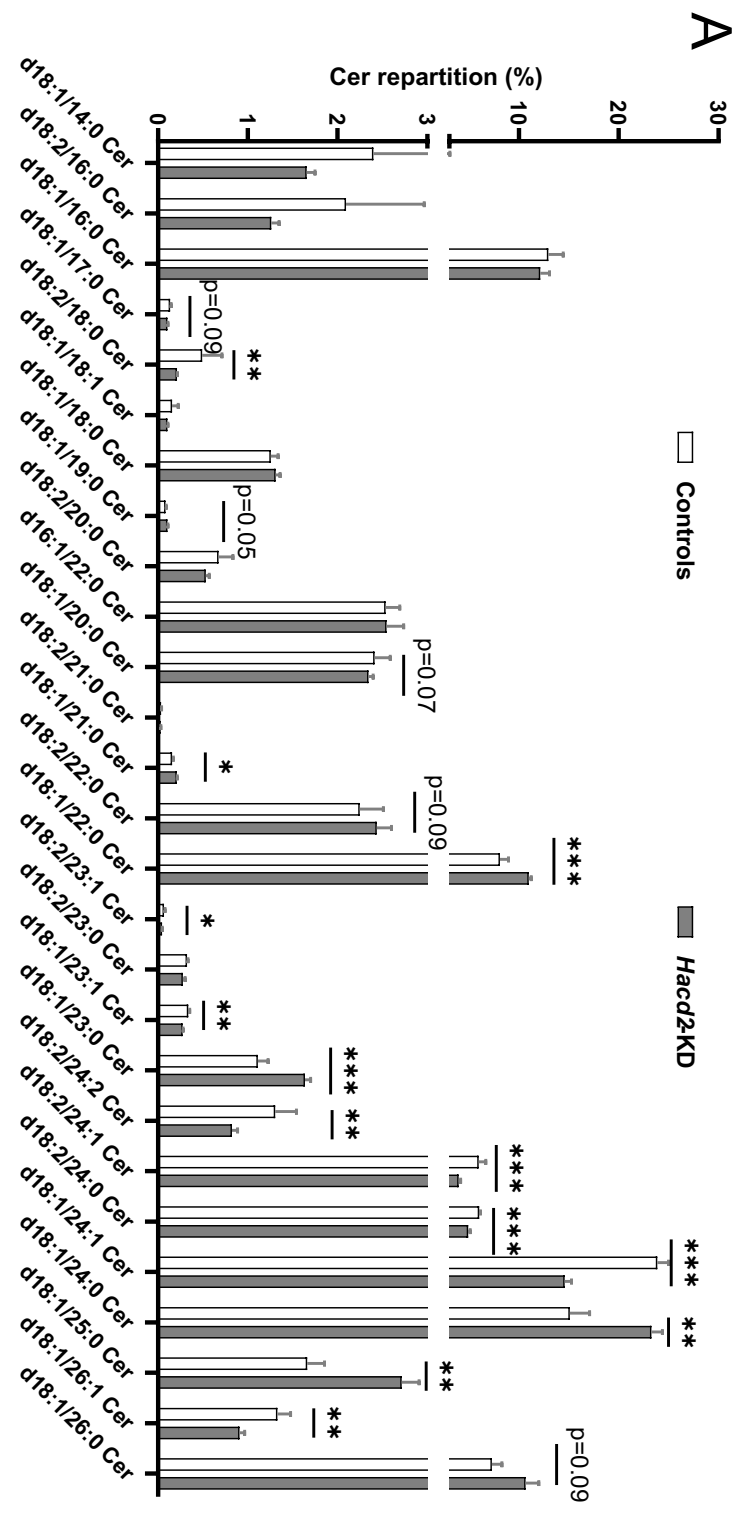


Figure S1

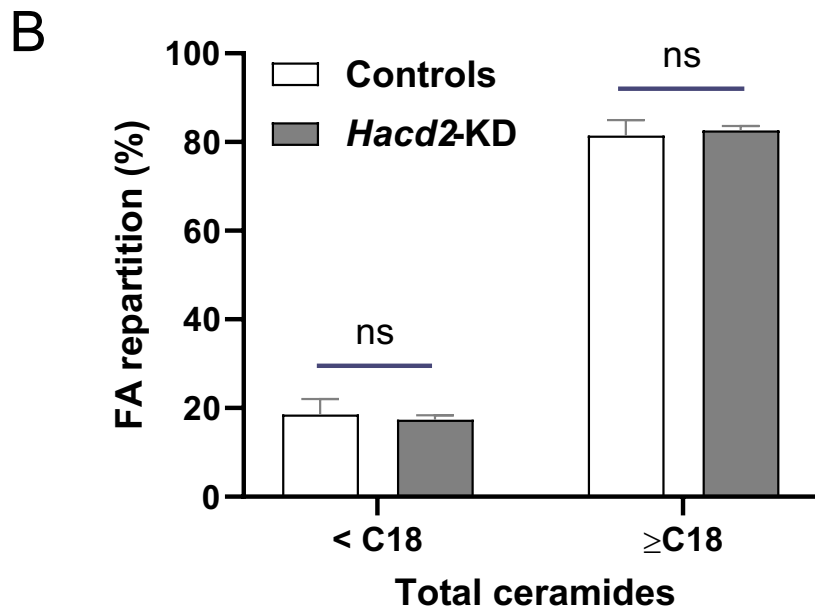
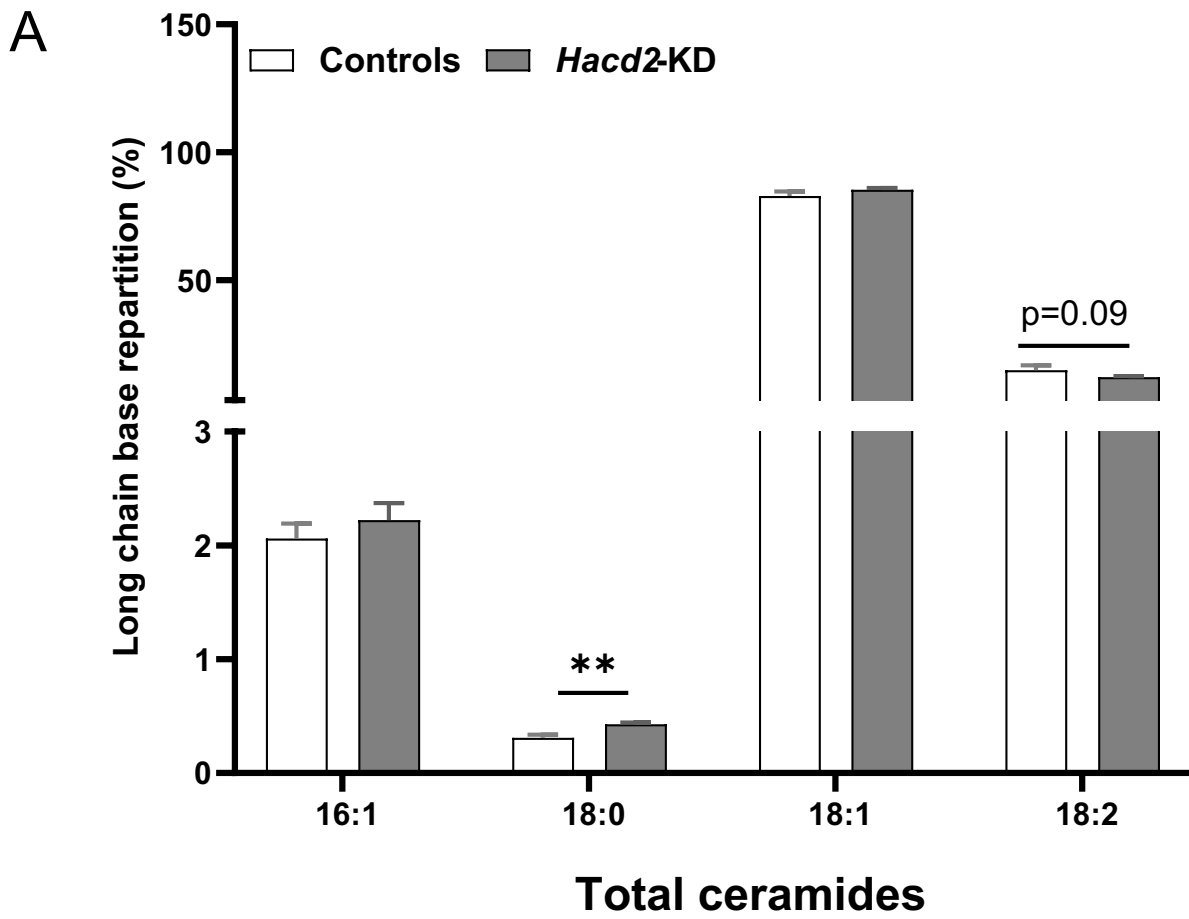


Table S1: Sequence of qPCR primers.

Related to Materials and methods.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Actin</i>	GGGTCAGAAGGATTCCTATG	GGTTCTCAAACATGATCTGGG
<i>Hacd1-fl</i>	ATGAAGAGAGCGTGGTGCTT	AAGGCGGCGTATATTGTGAG
<i>Hacd2 (residual)</i>	12F: GGTGATGACGGCGGGGTGGCT	34R: GATGGCACAATCCCTATAGCAC
<i>Hacd2 (total)</i>	34F: TGCTATAGGGATTGTGCCATC	5R: ACGGATAATTTCCGTGATTGTCC
<i>Hacd3</i>	GACGTGCAGCAGAACCCTGCTATC	CTTCTGGACTGTGATGTTCCACC
<i>Hacd4</i>	CAGCTCACAGAGAGAGTGATC	GAGTGTTTGACTGAGCCATGTC
<i>Rpl32</i>	GCTGCTGATGTGCAACAAA	GGGATTGGTGACTCTGATGG

PUBLICATION 3: CARDIOLIPIN CONTENT CONTROLS
MITOCHONDRIAL COUPLING AND ENERGETIC EFFICIENCY IN
MUSCLE, SCIENCE ADVANCES, JANUARY 1ST 2021

DOI: 10.1126/sciadv.abd6322

Problématique

Le laboratoire a observé qu'à l'âge adulte, les souris *Hacd1*-KO semblaient prendre moins de poids que leurs frères de portée WT, alors même qu'elles ont une activité physique réduite du fait de la myopathie, avec une locomotion spontanée réduite de moitié. Cet élément laissant présager un métabolisme accru, nous avons évalué cet aspect en soumettant les individus à un régime riche en graisse (*High Fat Diet*, HFD). Nous avons en parallèle caractérisé chez des individus soumis à un régime standard (*Normal diet*, ND) les différents paramètres liés à la fonction mitochondriale, qu'ils soient fonctionnels ou structurels.

Méthodologie et résultats

Les souris WT en HFD présentent une prise de poids importante, alors que les individus *Hacd1*-KO présentent une prise de poids modérée, n'atteignant pas en HFD le poids de souris WT en ND, et ce malgré une locomotion spontanée réduite et une consommation alimentaire identique aux WT. Elles présentent ainsi une faible quantité de graisse blanche accumulée, et une faible efficacité calorique (les calories consommées amènent à une faible prise de poids). Une étude par calorimétrie indirecte montre que ceci est dû à une augmentation du métabolisme global chez ces individus. Nous avons confirmé que cet effet était aussi visible chez les individus en ND. Les individus *Hacd1*-KO présentent aussi une meilleure tolérance au glucose, c'est-à-dire qu'elles le métabolisent plus rapidement, ce qui est surprenant compte tenu du fait que leur masse musculaire, siège du métabolisme glucidique, est réduite (données non montrées).

Nous avons observé, par coloration histologique sur coupes de muscles, par dosage enzymatique et par western blot que la masse mitochondriale est augmentée chez les individus *Hacd1*-KO. Cette augmentation est associée à une augmentation de l'oxydation des acides gras. De manière intéressante, cet effet est restreint au muscle squelettique, dans lesquels est exprimé l'isoforme active d'*Hacd1*.

De plus, nous avons observé des dilatations terminales des crêtes mitochondriales, ces invaginations de la membrane interne mitochondriale, support de la phosphorylation oxydative. Cette structure étant primordiale pour le fonctionnement mitochondrial, nous nous sommes intéressés à la respiration, et avons remarqué un défaut de couplage entre l'oxydation de substrats énergétiques dans la chaîne de transport des électrons et la phosphorylation de

l'ADP en ATP. Ceci amène ainsi à une forte consommation énergétique pour une faible production d'ATP, d'où la protection contre l'obésité.

L'oligomérisation de l'ATP synthase et l'organisation des complexes de la chaîne respiratoire en super complexes sont normaux chez les animaux *Hacd1-KO* et ne peuvent donc expliquer la réduction de couplage observée. Par contre, ce défaut peut s'expliquer par la structure inappropriée des crêtes, en lien avec une réduction par deux de la teneur des mitochondries en phospholipides, en particulier la cardiolipine (CL), un phospholipide spécifique de la membrane interne, essentiel à sa structure. Pour tester si la diminution en CL est la cause du défaut de couplage mitochondrial, nous avons enrichi les mitochondries isolées d'individus *Hacd1-KO* en CL à l'aide de vésicules lipidiques, et avons noté que cet enrichissement permet de rétablir un couplage normal.

Conclusion - discussion

Nous avons montré dans cet article un lien fort entre composition lipidique des membranes mitochondriales et fonctionnement respiratoire. Ainsi, un défaut de composition peut amener à un défaut de fonctionnement, un métabolisme accru et donc une protection contre l'obésité. Cet effet est d'autant plus fort que ce défaut de couplage n'est présent que dans les muscles squelettiques : nous avons donc un modèle d'augmentation du métabolisme global de l'organisme *via* une inhibition musculaire de l'expression d'une protéine impliquée dans la synthèse des AGTLC. La modulation d'une enzyme de cette voie serait donc une thérapie envisageable dans le cadre des syndromes métaboliques. De plus, la quantité musculaire de la CL peut directement influencer la balance énergétique au niveau de l'organisme.

Inversement, il semblerait qu'une modulation de la composition lipidique des membranes mitochondriales puisse suffire à rétablir un fonctionnement normal mitochondrial chez les souris *Hacd1-KO*.

De plus, nous détenons ici un nouveau modèle de déficit en cardiolipine, qui révèle un nouvel acteur de la voie de synthèse des phospholipides mitochondriaux.

Ce modèle montre qu'une réduction du couplage uniquement dans le muscle squelettique permettrait de combattre l'obésité, malgré peu d'exercice et une masse musculaire réduite. De plus, aucun effet secondaire sur le cœur n'est observé, apportant une sécurité supplémentaire au modèle.

Ma contribution

J'ai participé à la réalisation des expériences présentes dans ce papier à différentes étapes. En effet, j'ai manipulé les individus pendant toute la durée de l'expérience de HFD. J'ai aussi réalisé les pesées des individus, participé aux tests de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline, organisé les acclimatations et les exercices sur tapis de course, ainsi que tous les

prélèvements post-mortem. Sur ceux-ci, j'ai aussi bien fait de l'histologie, de la préparation d'échantillons pour microscopie électronique que le traitement des images acquises. J'ai assisté Alexandre Prola dans les expériences de respiration, préparé les échantillons pour analyse lipidomique et fait des RT-qPCR.

Ainsi, bien que n'ayant pas été l'instigatrice des idées du projet, j'ai été présente dans la réalisation de la plupart des expériences présentes dans ce papier, que ce soit en assistance ou en autonomie.

DISEASES AND DISORDERS

Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle

Alexandre Prola^{1,2,3}, Jordan Blondelle^{1,2,3*}, Aymeline Vandestienne^{1,2,3*}, Jérôme Piquereau⁴, Raphaël G. P. Denis⁵, Stéphane Guyot⁶, Hadrien Chauvin^{1,2,3}, Arnaud Mourier⁷, Marie Maurer^{1,2,3}, Céline Henry⁸, Nahed Khadhraoui^{1,2,3}, Cindy Gallerne^{1,2,3}, Thibaut Molinié⁷, Guillaume Courtin^{1,2,3}, Laurent Guillaud^{1,2,3}, Mélanie Gressette⁴, Audrey Solgadi⁹, Florent Dumont⁹, Julien Castel⁵, Julien Ternacle¹⁰, Jean Demarquoy⁶, Alexandra Malgoyre^{11,12}, Nathalie Koulmann^{11,12,13}, Geneviève Derumeaux¹⁰, Marie-France Giraud^{7,8}, Frédéric Joubert¹², Vladimir Veksler⁴, Serge Luquet⁵, Frédéric Relaix^{1,2,3†}, Laurent Tiret^{1,2,3†}, Fanny Pilot-Storck^{1,2,3†}

Unbalanced energy partitioning participates in the rise of obesity, a major public health concern in many countries. Increasing basal energy expenditure has been proposed as a strategy to fight obesity yet raises efficiency and safety concerns. Here, we show that mice deficient for a muscle-specific enzyme of very-long-chain fatty acid synthesis display increased basal energy expenditure and protection against high-fat diet-induced obesity. Mechanistically, muscle-specific modulation of the very-long-chain fatty acid pathway was associated with a reduced content of the inner mitochondrial membrane phospholipid cardiolipin and a blunted coupling efficiency between the respiratory chain and adenosine 5'-triphosphate (ATP) synthase, which was restored by cardiolipin enrichment. Our study reveals that selective increase of lipid oxidative capacities in skeletal muscle, through the cardiolipin-dependent lowering of mitochondrial ATP production, provides an effective option against obesity at the whole-body level.

INTRODUCTION

Increased food intake and prevailing sedentary activities cause a positive energy balance, leading to an unprecedented obesity epidemic, which is nowadays rising at an alarming pace (1). Obesity is not only associated with many other comorbidities including metabolic disorders (i.e., insulin resistance, metabolic syndrome, and diabetes) but also cancer, cardiovascular, or emerging infectious diseases, increasing therefore the risk of mortality (2–5). Beneficial effects of regular exercise to counter obesity and related diseases have been demonstrated but, unfortunately, are hampered by poor compliance and low energy expenditure (6, 7). In this context, increasing basal energy expenditure, independently of exercise, might be an interesting strategy to prevent obesity-related complications (8). Basal energy production relies almost entirely on the mitochondrial function ensuring the efficient production of adenosine 5'-triphosphate (ATP) from energetic substrates through the oxidative phosphorylation (OXPHOS) process, which takes place in the inner mitochondrial membrane (IMM) and couples the generation of a transmembrane

gradient of protons by the respiratory chain to the adenosine 5'-diphosphate (ADP) phosphorylation by ATP synthase (9). Any reduction in OXPHOS coupling decreases energetic yield and may lead to increased expenditure of energy substrates to counteract low ATP productivity (8). Mitochondrial organization and function is an active field of research, and further insights into the physiological mechanisms that regulate mitochondrial coupling efficiency are a prerequisite for the identification of innovative therapeutic strategies. A notable feature of mitochondria stands in its highly specialized structure. In particular, folding of the IMM into packed cristae is thought to allow optimized organization of respiratory complexes and ATP synthase for efficient ATP production (10). Tight folding of such an extended membrane is not a classical organization of lipid bilayer sheets and involves a dedicated lipid composition. Notably, the IMM contains the specific four-acyl chain phospholipid cardiolipin, which has been shown to favor proper cristae folding, respiratory chain, and ATP synthase function (11–14). Modulation of cardiolipin composition is likely one of the levers used by cells to optimize energetic yield in highly ATP-demanding tissues. Mutations in tafazzin, a cardiolipin-remodeling enzyme that tends to homogenize cardiolipin chains to linoleic acyls (C18:2) in heart and skeletal muscle, hamper mitochondrial function and are associated with cardiomyopathy and myopathy (15, 16). Whether other lipid-based mechanisms are involved in optimizing ATP production in these tissues remains to be deciphered. Fatty acids with 18 carbons or more are synthesized by the very-long-chain fatty acid (VLCFA) enzymatic complex in the endoplasmic reticulum membrane through a four-step cycle (17, 18). The first step of elongation is accomplished by fatty acid elongases encoded by seven different *ELOVL* genes with overlapping expression profiles, and the second and fourth steps are under the control of unique genes (18). The third step is catalyzed by 3-hydroxyacyl-coenzyme A (CoA) dehydratase (HACD) proteins, which are encoded by four different genes (17, 19). Notably,

¹Université Paris-Est Créteil, INSERM, IMRB, Team Relaix, F-94010 Créteil, France.

²EnvA, IMRB, F-94700 Maisons-Alfort, France. ³EFS, IMRB, F-94010 Créteil, France.

⁴UMR-S 1180, INSERM, Université Paris-Sud, Université Paris-Saclay, F-92296 Châtenay-Malabry, France. ⁵Université de Paris, BFA, UMR 8251, CNRS, F-75014 Paris, France.

⁶Université Bourgogne Franche-Comté, AgroSup Dijon, PAM UMR A 02.102, F-21000 Dijon, France. ⁷Université Bordeaux, CNRS, IBGC, UMR 5095, F-33000 Bordeaux, France. ⁸PAPSSO, Université Paris-Saclay, INRAE, AgroParisTech, Micalis Institute, F-78350 Jouy-en-Josas, France. ⁹UMS IPSIT, Université Paris-Saclay, F-92296 Châtenay-Malabry, France. ¹⁰Université Paris-Est Créteil, INSERM, IMRB, Team Derumeaux, F-94010 Créteil, France. ¹¹Département Environnements Opérationnels, Unité de Physiologie des Exercices et Activités en Conditions Extrêmes, Institut de Recherche Biomédicale des Armées, F-91220 Brétigny-Sur-Orge, France. ¹²LBEPs, Université Evry, IRBA, Université Paris-Saclay, F-91025 Evry, France. ¹³École du Val de Grâce, Place Alphonse Laveran, F-75005 Paris, France.

*These authors contributed equally to this work.

†Corresponding author. Email: fanny.storck@vet-alfort.fr (F.P.-S.); laurent.tiret@vet-alfort.fr (L.T.); frederic.reliax@inserm.fr (F.R.)

expression of the *HACD1* active isoform is restricted to the heart and skeletal muscle, in which it promotes efficient myoblast fusion during muscle development (20). While *HACD1* deficiency leads to congenital myopathies in humans, dogs, and mice sharing an early and stable reduction in muscle mass and strength (20–23), the metabolic consequences of *HACD1* deficiency remained to be deciphered.

Counterintuitively, we describe here that *Hacd1*-deficient mice stay lean throughout life and that they are protected against diet-induced obesity. An in-depth analysis of their metabolic features uncovers an increased expenditure of energy substrates by the skeletal muscle alone, independently of locomotor activity and excluding the heart, whose function remains unchanged. Upon *Hacd1* deficiency, mitochondria of skeletal muscle display a reduced coupling between substrates oxidation and ADP phosphorylation by the ATP synthase, responsible for higher energy substrate consumption. Skeletal muscle mitochondria of *Hacd1*-deficient mice exhibit modified cristae and reduced cardiolipin content, and cardiolipin enrichment fully rescues respiratory coupling efficiency in isolated mitochondria.

Together, our data reveal that skeletal muscle benefits from a specific mechanism involving the VLCFA elongation cycle to ensure optimized ATP production and that cardiolipin content in this tissue influences energy balance at the body level.

RESULTS

Genetic invalidation of *Hacd1* leads to protection against diet-induced obesity

Hacd1-knockout (KO) mice present mild myopathic features characterized by a congenital reduction in muscle mass (20) and reduced spontaneous locomotor activity, both in distance and speed (Fig. 1A and fig. S1A). Unexpectedly, *Hacd1*-KO mice did not gain more weight but remained leaner than wild-type (WT) mice throughout their life span (Fig. 1, B and C). To investigate whether this observation could be related to a difference in energy homeostasis, we challenged *Hacd1*-KO mice with high-fat diet (HFD). As expected, WT mice regularly gained weight and became obese following a 2-month HFD (Fig. 1, C and D). On the contrary, *Hacd1*-KO mice showed only moderate weight gain, thus escaping obesity (Fig. 1, C and D). Accordingly, *Hacd1*-KO mice were more tolerant to a glucose overload than WT mice after HFD (Fig. 1, E and F). Furthermore, we found a prominent reduction in fat accumulation in *Hacd1*-KO mice after HFD compared to WT mice. In particular, we observed a blunted increase in white adipose tissue (WAT) weight (Fig. 1G, fig. S1B, and table S1), while a lesser amount of liver steatosis occurred in *Hacd1*-KO mice as compared with WT mice (fig. S1C).

Resistance to HFD-induced obesity in *Hacd1*-KO mice could be explained either by a reduction in energy intake or by an increase in energy substrate expenditure. Analysis of food consumption revealed similar energy intake per animal for both genotypes (fig. S1D) and, thus, higher energy intake per gram of body mass in *Hacd1*-KO mice, considering their lower mass (fig. S1E). Fecal lipid content was similar between genotypes (fig. S1F), excluding defective intestinal absorption as a cause of energy loss. Together, feed efficiency, i.e., body weight gain per eaten calories, was markedly reduced in *Hacd1*-KO mice (Fig. 1H), pointing to increased energy substrate expenditure as causative for the observed resistance to HFD-induced obesity.

An indirect calorimetry analysis of metabolic efficiency was performed both in normal diet (ND) and after a switch to HFD. After

acclimatization to HFD, energy expenditure was higher at every time point in *Hacd1*-KO mice than in WT mice, resulting in a significant increase in energy expenditure over a 24-hour period (Fig. 1I). Basal metabolism was found significantly increased in *Hacd1*-KO mice compared to WT, both during day and night periods (Fig. 1J).

Increased energy expenditure and reduced feed efficiency were also found in ND, but to a lesser extent than in HFD (fig. S1, G and H), indicating that resistance to HFD-induced obesity of *Hacd1*-KO mice was linked to a preexisting metabolic feature that diverted energy from storage and was magnified upon exposure to lipid-based substrate.

Brown adipose tissue (BAT) has a specific capacity to dissipate energy through heat production by mitochondrial uncoupling due to proton leakage by uncoupling proteins (UCP) through the IMM (8). BAT mass was found to be reduced in *Hacd1*-KO mice compared to WT (table S1), and expression of *Ucp* genes was similar between genotypes in BAT and in other metabolically active tissues (fig. S1, I to K), thus excluding BAT involvement in the higher energy expenditure of *Hacd1*-KO mice. Since muscle mass represents a substantial pole of energy expenditure, we next explored the contribution of skeletal muscle in the metabolic phenotype observed in *Hacd1*-KO mice.

Oxidative capacities are increased in the skeletal muscles of *Hacd1*-KO mice

Expression of *Hacd1-fl* mRNA that encodes the catalytically active isoform of *Hacd1* is nearly restricted to striated muscles (20); hence, we decided to investigate heart and skeletal muscle function in *Hacd1*-KO mice. In-depth echocardiographic analysis of heart function revealed no difference between WT and *Hacd1*-KO mice (table S2). On the contrary, we observed a metabolic switch of skeletal muscle fibers toward a more oxidative, less glycolytic activity in *Hacd1*-KO mice. First observed on histological sections of the mixed tibialis anterior muscle (Fig. 2A), the oxidative switch was exemplified by a higher mitochondrial cytochrome *c* oxidase (COX) activity both in soleus and superficial gastrocnemius muscles, which are oxidative and glycolytic, respectively (Fig. 2B). Quantification of citrate synthase (CS) activity and protein content along with CV-ATP5A and VDAC mitochondrial proteins expression confirmed an increase in mitochondrial mass in *Hacd1*-KO skeletal muscle (Fig. 2, C to E), which was linked to increased expression of mitochondrial biogenesis promoters such as the *Ppargc1a* (*PGC-1alpha*), *Ppargc1b* (*PGC-1beta*), *Tfam*, and *Nrf-1* genes (fig. S2A). Noteworthy, mitochondrial mass was unchanged in heart, liver, WAT, and BAT (fig. S2, B and C).

The higher oxidative activity was associated with elevated fat oxidation by *Hacd1*-KO mice during the night, a period normally characterized by low-fat oxidation (Fig. 2, F and G). Accordingly, skeletal muscle showed increased capacity to oxidize fatty acids in vitro (Fig. 2H). This metabolic switch was accompanied by transcriptional changes in muscle characterized by an up-regulation of genes involved in fatty acid β -oxidation and lipid signaling pathways and a reciprocal decrease in lipogenesis genes (fig. S2D). This transcriptional signature was not observed in other metabolically active tissues such as the heart, liver, WAT, and BAT (fig. S2E). Furthermore, a nontargeted large-scale proteomic analysis (24) revealed that 37% of the up-regulated proteins were involved in metabolic processes (fig. S2F and table S3), in particular, the mitochondrial tricarboxylic acid cycle pathway was overrepresented by a factor of 37.5 ($P = 0.0143$) (fig. S2G and table S3). Together, these results point to a specific elevation of mitochondrial oxidative activity in

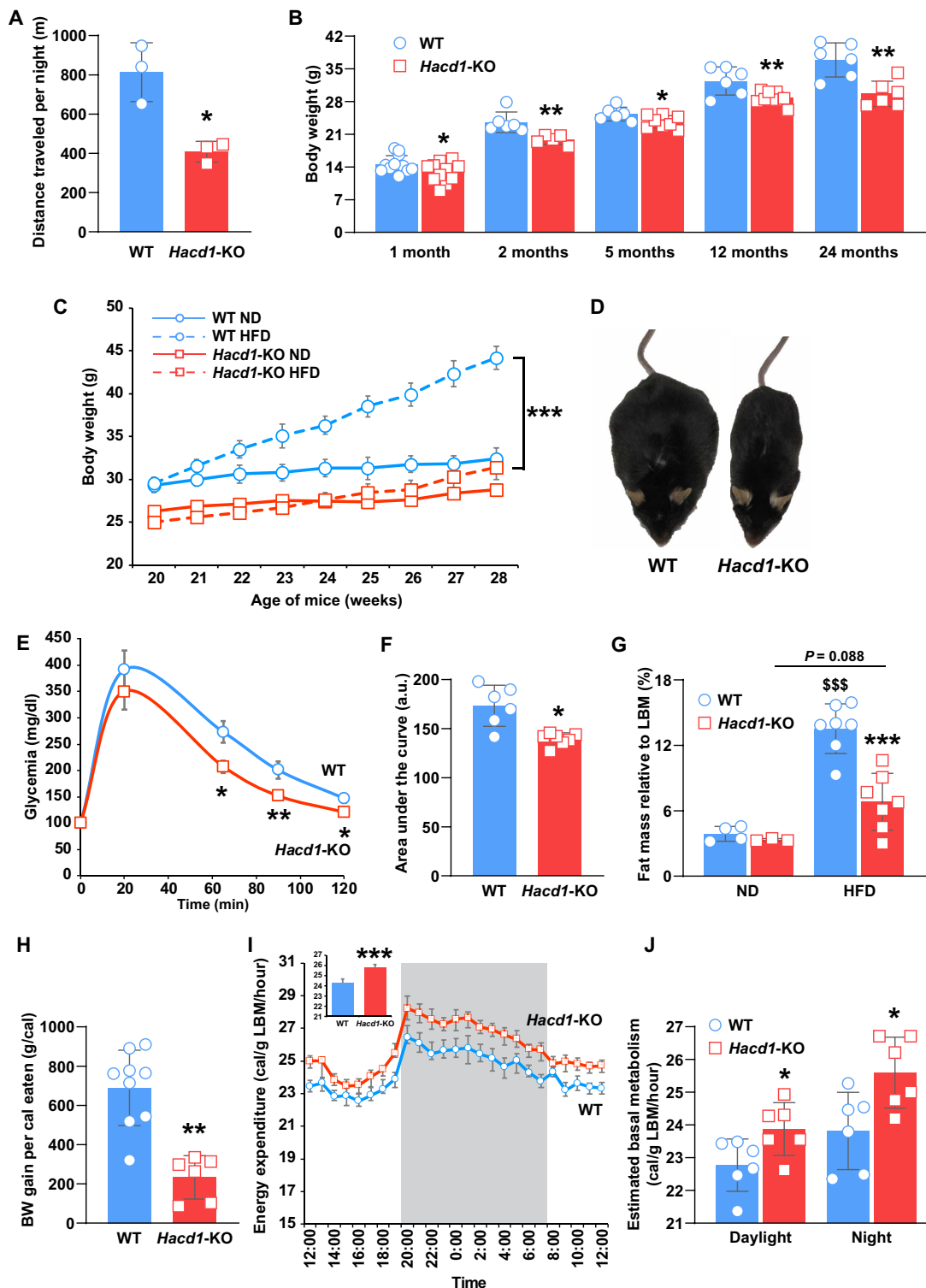


Fig. 1. Increased energy expenditure protects *Hacd1*-KO mice against HFD-induced obesity. (A) Spontaneous distance traveled per night by wild-type (WT) and *Hacd1*-KO mice. (B) Body weight evolution over life. (C) Body weight evolution of mice fed during 9 weeks with HFD, compared to age-matched mice fed with normal diet (ND). (D) Morphology of WT and *Hacd1*-KO mice after 9 weeks of HFD. (E) Glycemia measured after fasting and assessed during 120 min after an intraperitoneal glucose injection at T_0 in mice fed during 9 weeks with HFD. (F) Area under the glycemia curves displayed in (E). a.u., arbitrary units. (G) Total body fat percentage (adiposity index) after 9 weeks of ND or HFD, expressed as a percentage of the eviscerated body mass (lean body mass, LBM). (H) Feed efficiency during the 9-week period of HFD (body weight, BW). (I) Circadian energy expenditure measured by indirect calorimetry under HFD; the active period of night is shaded. Mean hourly energy expenditure during the assessment period is represented as histogram. (J) Estimated basal metabolism during the assessment period of (I) during daylight and night. Error bars \pm SE; * P < 0.05, ** P < 0.01, and *** P < 0.001 versus respective WT values; \$\$\$ P < 0.001 versus respective ND values. Photo credit for (D): Alexandre Prola, EnvA.

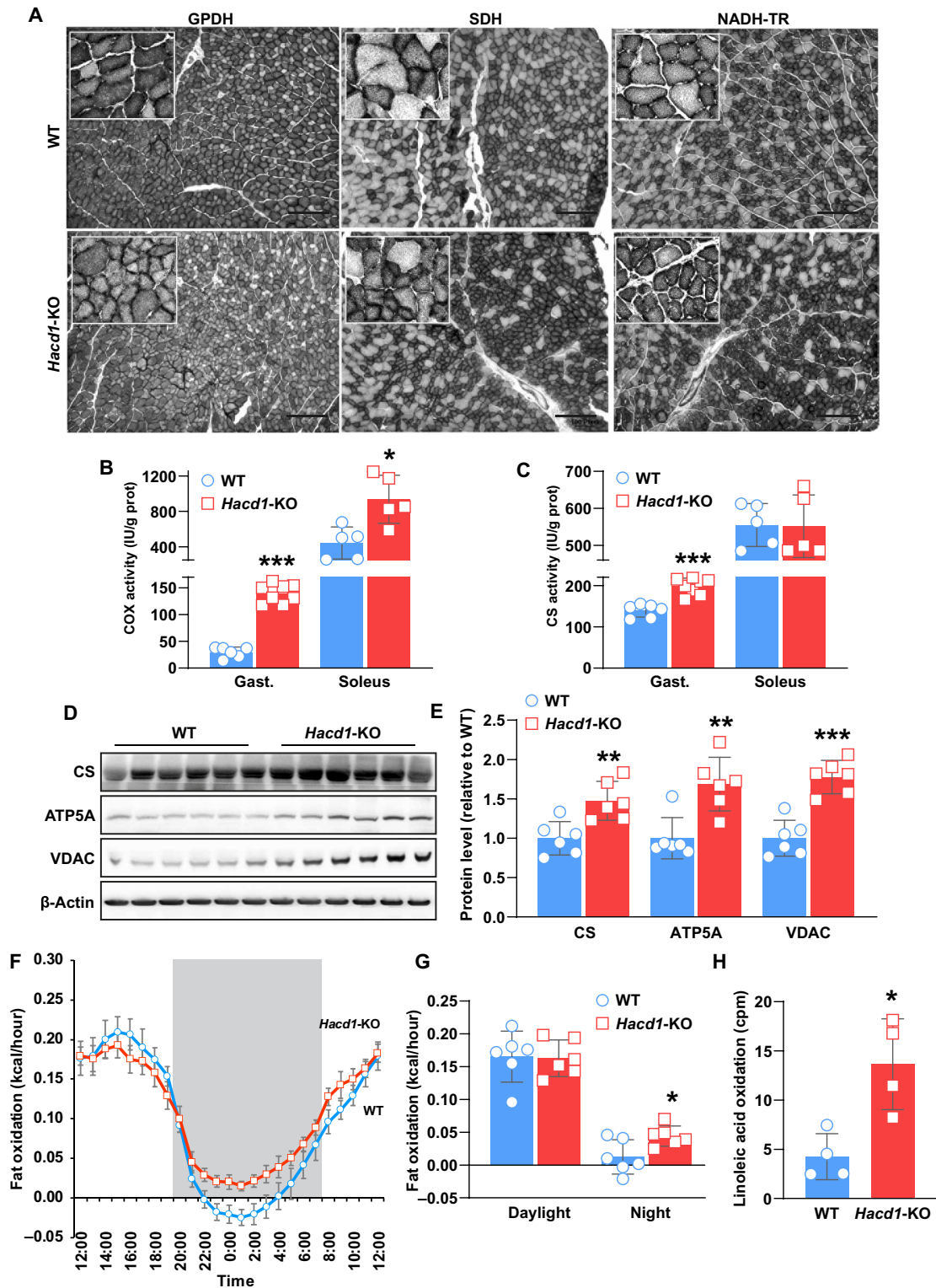


Fig. 2. Skeletal muscle of *Hacd1-KO* mice displays increased oxidative activity. (A) Glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH), succinate dehydrogenase (SDH), and reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase (NADH tetrazolium reductase reaction, NADH-TR) activity on tibialis anterior muscle sections. Note the decreased GPDH (glycolytic) and increased SDH and NADH-TR (oxidative) activity on *Hacd1-KO* mice sections. (B) Cytochrome c oxidase (COX; or complex IV) activity in superficial gastrocnemius and soleus muscles. (C) CS activity in superficial gastrocnemius and soleus muscles. IU, International Unit. (D and E) Representative immunoblots (D) and quantification (E) of CS, ATP5A, and VDAC normalized to β -actin in superficial gastrocnemius muscle. (F) Circadian fat oxidation under ND measured by indirect calorimetry; the active period of night is shaded. (G) Fat oxidation during the assessment period of (F) during daylight and night. (H) ^{14}C -labeled linoleic acid consumption rates in isolated gastrocnemius muscle. Scale bars, 200 μm (A). Error bars \pm SE; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and *** $P < 0.001$ versus respective WT values.

skeletal muscles as a driving force for the lipid-based substrate preference and elevated energy expenditure observed in *Hacd1*-KO mice.

HACD1 deficiency is associated with increased energy dissipation in skeletal muscle mitochondria

Because *Hacd1*-KO mice had reduced locomotor activity, we excluded the hypothesis that the increased oxidative activity sustained enhanced muscle contractility. We thus investigated whether it would reflect a reduced mitochondrial efficiency in ATP production in skeletal muscle, which would drive more energy substrate consumption.

Ultrastructural analysis of mitochondria by electron microscopy in both soleus and gastrocnemius muscles revealed a high proportion of altered cristae, with global enlargement and frequent tip dilation (Fig. 3, A to C, and fig. S3, A to C). Furthermore, evaluation of respiratory parameters was performed on isolated mitochondria from tibialis anterior muscle (Fig. 3, D and E, and table S4). Whereas basal, nonphosphorylating oxidation was similar in *Hacd1*-KO and WT mice, phosphorylating oxidation that links proton transfer to ATP production was markedly reduced (Fig. 3D), leading to a strong decrease in the respiratory coupling ratio, i.e., the ratio between coupled and uncoupled phosphorylation (Fig. 3E). Accordingly, the ATP production flux by muscle mitochondria was reduced (Fig. 3F), leading to a diminished ATP/O ratio indicative of deficient mitochondrial OXPHOS yield (Fig. 3G). When considering the increased mitochondrial mass of muscle fibers in *Hacd1*-KO mice (Fig. 2, B to E), consistent results were obtained on permeabilized muscle fibers from soleus and gastrocnemius muscles, both with pyruvate and fatty acid as a substrate (fig. S3, D to I, and table S4), confirming that reduced mitochondrial coupling was a general feature of skeletal muscles in *Hacd1*-KO mice. Noteworthy, permeabilized cardiac fibers showed normal respiratory parameters (fig. S3, J to L), restricting the mitochondrial perturbation to skeletal muscles.

To further evaluate consequences of a reduced skeletal muscle mitochondrial efficiency *in vivo*, we challenged mice with a submaximal treadmill exercise. In *Hacd1*-KO mice compared to WT, we quantified a significant twofold reduction in skeletal muscle ATP content after the exercise (Fig. 3H). Accordingly, phosphorylation of the adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase (AMPK) energy sensor was increased in muscle after exercise in *Hacd1*-KO mice, as well as blood lactate concentration (Fig. 3, I to K).

A muscle mitochondrial reduced coupling distinct from the canonical uncoupling

Hacd1-related mitochondrial perturbation in skeletal muscle was accompanied by neither detectable modification of redox potential in both states 3 and 4 (fig. S4A), nor difference in the generation of $\Delta\Psi_m$ in state 4 (fig. S4B). This demonstrated that successive steps of reduced form of nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) production by dehydrogenases, NADH consumption by the respiratory chain, and establishment of proton gradient by the respiratory chain, respectively, were all unaffected. Contrasting with conditions harboring specific ATP synthase deficiency (25), consumption of $\Delta\Psi_m$ in state 3 was also normal (fig. S4B). Besides, preserved nonphosphorylating respiration indicated that proton leak was unchanged (Fig. 3D). These data confirmed that the reduced mitochondrial coupling characterized in skeletal muscles of *Hacd1*-KO mice is distinct from the canonical uncoupling. It induced no oxidative stress, as evidenced by normal ratio of aconitase/fumarase activities, expression of antioxidant genes and content of peroxidated lipids

or carbonylated proteins (fig. S4, C to G). Also, the assembly of the supercomplexes, the oligomerization of ATP synthase, and the mitochondrial translocase activity, providing ADP to the ATP synthase, were all normal (fig. S4, H to J). Together, these results excluded an intrinsic defective function of the respiratory chain or the ATP synthase in *Hacd1*-deficient muscles, and rather suggested a functional impairment of proton transfer from the respiratory chain to the ATP synthase.

Mitochondrial coupling efficiency in skeletal muscle depends on cardiolipin content

Given the role of *Hacd1* in the VLCFA elongation cycle, we wondered how its deficiency would alter the composition or content of the key lipids within the IMM that may be involved in the supply of protons to ATP synthase. Cardiolipin is a phospholipid specifically enriched in the IMM that has been involved in proper cristae folding (12, 13). Furthermore, its negative charge and abundance argue for specific interactions with protons (26).

Quantification of cardiolipin in skeletal muscle mitochondria from *Hacd1*-KO mice showed a significant decrease in both its absolute and relative content (Fig. 4A and fig. S5, A and B), whereas it was unchanged in cardiac mitochondria (fig. S5, C and D). Cardiolipin contains four variable acyl chains and forms a family of distinct species whose repartition is tightly controlled in cardiac and skeletal muscles (27). The slight reduction in the C18-C26/C10-C17 fatty acids ratio observed in mitochondria of *Hacd1*-KO mice had no impact on cardiolipin repartition (fig. S5, E and F). The comprehensive quantification of cardiolipin species in skeletal muscles of *Hacd1*-KO mice revealed an unchanged overall repartition (Fig. 4B and fig. S6, A to D). To document the consequences of the reduction in cardiolipin content beyond the observed abnormalities of cristae, we analyzed the properties of the IMM, and we quantified changes in the longest lifetime components in 1-(4-trimethylammonio)phenyl)-6-phenyl-1,3,5-hexatriene *p*-toluenesulfonate (TMA-DPH) fluorescence lifetime decay that reflect the behavior of the probe within the most polar membrane domains (fig. S6E, table S5, and listing S1) (28).

Furthermore, to investigate whether the reduced cardiolipin content could be a limiting factor for ATP production in the specific context of HACD1 deficiency, we set up an original *in vitro* assay to enrich mitochondrial membranes with cardiolipin or phosphatidylcholine, a neutral and abundant phospholipid slightly increased in *Hacd1*-deficient muscle mitochondria (Fig. 4C and fig. S5B). Incorporation of the two phospholipids within the IMM was validated using fluorescent species (fig. S6F). The proof for cardiolipin enrichment in mitochondria, and more specifically in mitoplasts, was further obtained by the increased Acridine Orange 10-Nonyl Bromide (NAO probe) signal (fig. S6, G and H). Using this system, we then simultaneously measured O₂ consumption and ATP production of mitochondria and found a nonspecific decreased O₂ consumption and lowered ATP production after cardiolipin or phosphatidylcholine enrichment, under both *Hacd1*-KO and WT conditions (fig. S6, I and J). This may be due to respiratory chain complexes dilution within the membrane (29) or to an impairment in lipid arrangement following phospholipid enrichment. Noteworthy, specific enrichment of mitochondria from *Hacd1*-KO mice with cardiolipin fully rescued the ATP/O ratio that reflects coupling efficiency of ATP synthase activity with the respiratory chain function, while the ratio was markedly decreased by phosphatidylcholine enrichment under both *Hacd1*-KO and WT conditions (Fig. 4D). Together, these data

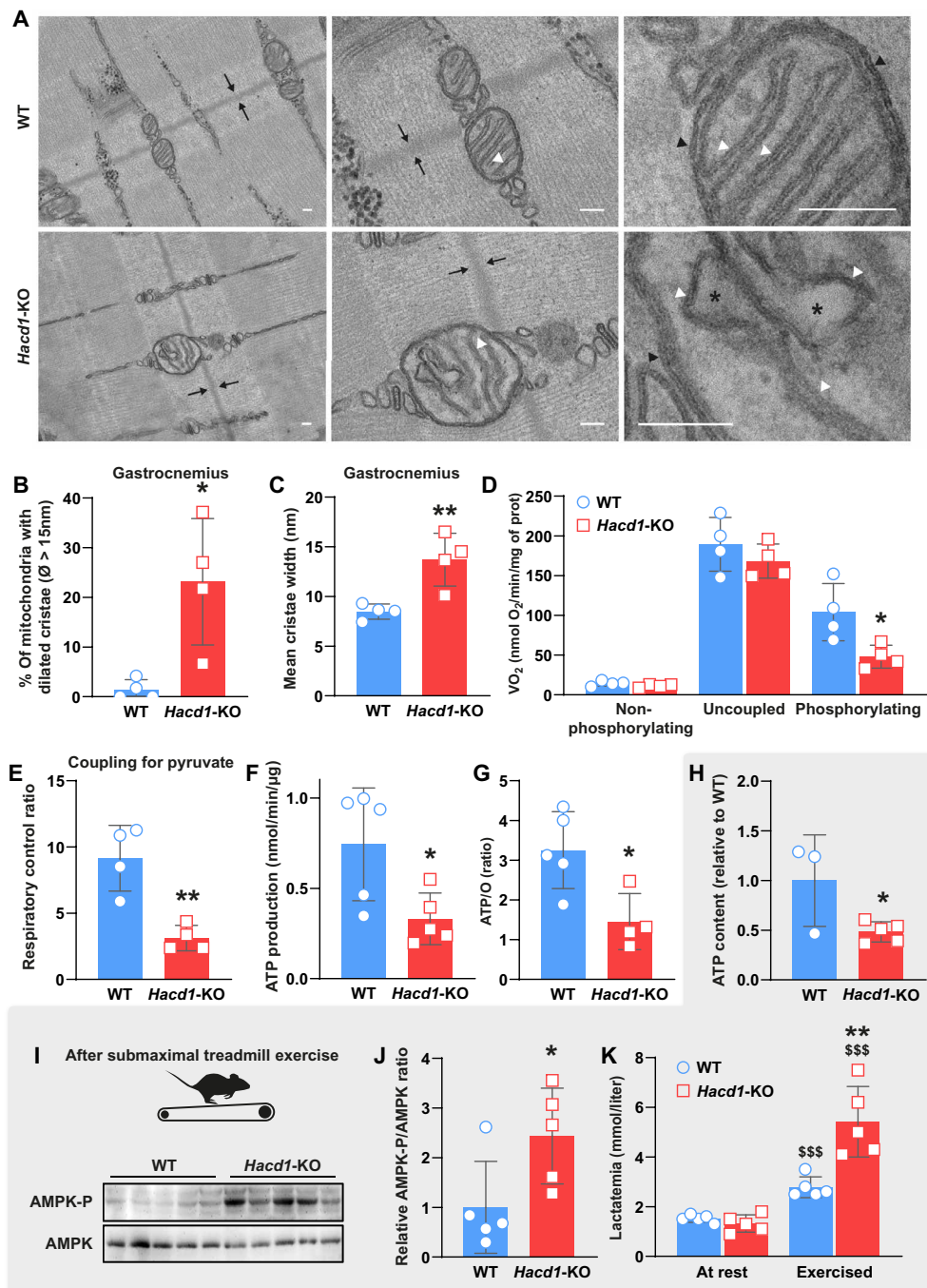


Fig. 3. Remodeled structure and lowered respiratory coupling of mitochondria lead to reduced ATP production in muscle of *Hacd1-KO* mice. (A) Transmission electron microscopy of longitudinal sections of myofibers from the superficial gastrocnemius muscle. Images are from datasets taken at a low ($\times 2500$, left), intermediate ($\times 10,000$, middle), and high ($\times 30,000$, right) magnification. The Z line is delimited by arrows. Cristae are regular tubular-shaped invaginations (white arrow heads) of the IMM, unambiguously identified on the same plane than the outer mitochondrial membrane (black arrow heads). Excessive dilation of cristae tips (asterisk) is frequently observed in *Hacd1-KO* myofibers. (B and C) Morphometric quantification of mitochondria containing cristae with excessively dilated tips (maximal diameter > 15 nm, in percentage) (B) and the mean of the maximal diameter of cristae (C). (D) Oxidation rate of freshly isolated mitochondria from tibialis anterior muscle in the presence of pyruvate plus ADP (phosphorylating), oligomycin (nonphosphorylating), and FCCP (uncoupled). (E) Mitochondrial coupling ratio for pyruvate (respiratory control ratio [RCR; state 3/state 4]) of isolated mitochondria from tibialis anterior muscle. (F) ATP production measured on isolated mitochondria from tibialis anterior muscle. (G) ATP/O ratio calculated from simultaneous recording of O_2 consumption and ATP production on isolated mitochondria from tibialis anterior muscle. (H) ATP content after submaximal exercise on treadmill in tibialis anterior muscle of *Hacd1-KO* mice, compared to WT mice, set to 1.0. (I to J) Representative immunoblots (I) and quantification (J) of phospho-AMPK (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase) and AMPK in tibialis anterior muscle after submaximal exercise on treadmill. (K) Blood lactate concentration (lactatemia) before (at rest) and after (exercised) a submaximal exercise on treadmill. Scale bars, 100 nm (A). Error bars \pm SE; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus respective WT values; *** $P < 0.001$ versus respective at rest values.

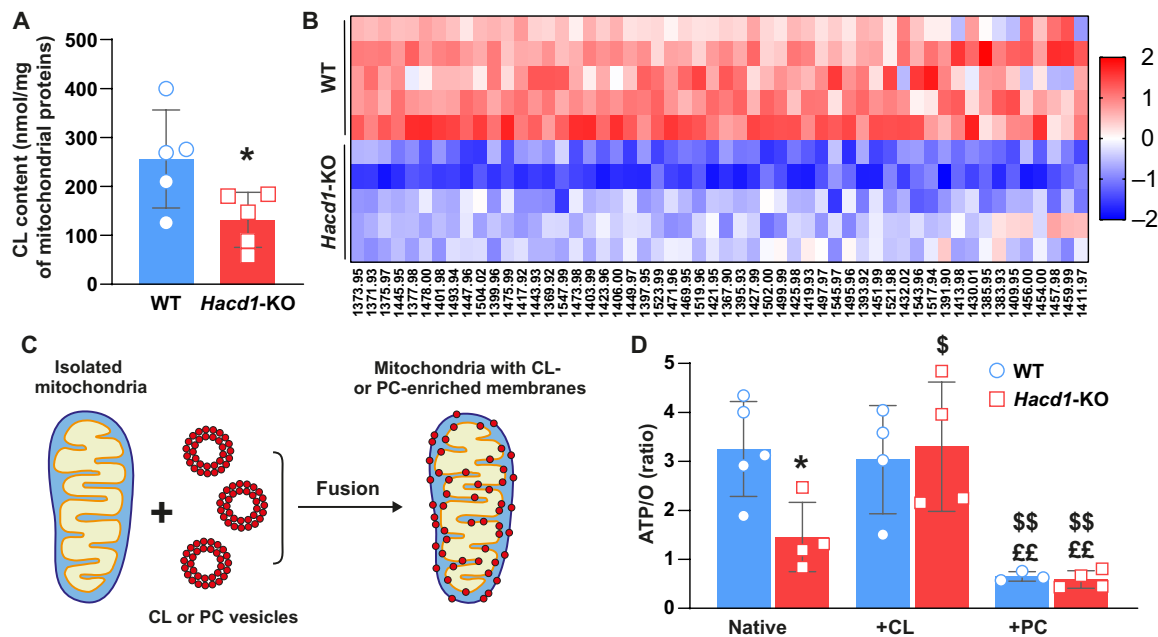


Fig. 4. Cardiolipin deficit in muscle mitochondria of *Hac1*-KO mice is responsible for reduced mitochondrial coupling. (A) Total cardiolipin content of mitochondria isolated from the tibialis anterior muscle, normalized to the mitochondrial protein content. (B) Heatmap of individually identified cardiolipin species in mitochondria isolated from tibialis anterior muscle of *Hac1*-KO mice, compared to WT mice. Colors show row z scores. (C) Diagram depicting the experimental steps allowing to enrich mitochondrial membranes with phospholipids. (D) ATP/O ratio calculated from simultaneous recording of O₂ consumption and ATP production of native, cardiolipin-enriched (+CL), and phosphatidylcholine-enriched (+PC) mitochondria isolated from tibialis anterior muscle of WT and *Hac1*-KO mice. Error bars ± SEM; **P* < 0.05 versus WT, ^{\$}*P* ≤ 0.05 and ^{\$\$}*P* ≤ 0.01 versus native, and ^{££}*P* ≤ 0.01 versus +CL.

demonstrate that efficient mitochondrial coupling in skeletal muscle depends on the cardiolipin content that is genetically controlled by *Hac1* expression.

DISCUSSION

In this study, we describe that lack of *Hac1*/VLCFA-dependent synthesis of the IMM phospholipid cardiolipin in skeletal muscles leads to whole-body protection against HFD-induced obesity through an atypical mechanism of reduced mitochondrial coupling efficiency that drives a shift toward increased lipid oxidation and basal energy expenditure.

We have identified that in *Hac1*-KO mice, skeletal muscle is a site of increased energy consumption, fostered by a surge in oxidative activity as a compensating means to overcome an ATP production deficit, resulting from the reduced coupling efficiency of remodeled mitochondria. Molecularly, the reduced coupling between phosphorylating and nonphosphorylating respiration was associated with reduced cardiolipin content, and we demonstrated that the addition of cardiolipin to isolated mitochondria from *Hac1*-KO mice rescued their coupling efficiency. This rescue experiment reveals a prominent role of cardiolipin content for a fully efficient mitochondrial coupling in skeletal muscle, which does not exclude a minor contribution, yet to be evaluated, of other phospholipids such as phosphatidylinositol.

Pharmacological induction of mitochondrial uncoupling with the aim of increasing lipid oxidation has been an appealing strategy to combat obesity and restore insulin sensitivity (8). Dinitrophenol (DNP), a potent mitochondrial uncoupling compound, was successfully used during three decades for weight loss, before being

withdrawn in 1938 because of its toxicity, mostly in highly ATP-demanding tissues including the heart (30). Among recent promising strategies is a controlled-release formulation for DNP that specifically targets the liver (31). Here, we provide a genetic proof of concept that targeting the skeletal muscle and halving the mitochondrial coupling efficiency in this tissue induce protection against diet-induced obesity in mice, with improved insulin sensitivity, no oxidative stress, and a fully preserved cardiac function. These benefits occurred in mice that display a reduced skeletal muscle mass and locomotor activity, a situation mimicking the deleterious clinical condition of most obese patients (6, 7). Our data represent in vivo demonstration that targeting a reduced coupling in skeletal muscle mitochondria is an actionable mechanism to confer protection against obesity, even in a context of low muscle mass and limited exercise capacity.

In parallel, our study provides evidence that the highly ATP-demanding skeletal muscle benefits from a specific genetic program for optimal mitochondrial efficiency and ATP production through *Hac1* expression. HACD enzymes participate in the VLCFA elongation cycle, which has been implicated in specific lipid synthesis in skin, retina, brain, or testis (18). Our study extends the field of VLCFA elongation cycle to cardiolipin metabolism in skeletal muscle as cardiolipin content was reduced in this tissue in *Hac1*-KO mice. Synthesis of cardiolipin, a four acyl-chain phospholipid specific of the IMM, is a complex process, with the last step consisting in remodeling of cardiolipin acyl chains by tafazzin, which results in an enrichment of linoleoyl chains (C18:2, ω-6) in heart and skeletal muscles (27). The functional importance of this reaction is illustrated by deleterious consequences of tafazzin deficiency, which induces the Barth syndrome characterized by a life-threatening infantile dilated

cardiomyopathy (15, 16). Notably, acyl chain repartition among cardiolipin species was unchanged in HACD1-deficient muscle mitochondria, indicating that the tafazzin-dependent step of cardiolipin maturation was unaffected. *Hacd1* is also expressed in the heart (20) but, serendipitously, its deficiency had no impact on cardiac mitochondrial function, likely because the redundant paralogous *Hacd* genes, highly expressed in the heart [our observations, (19, 32)], perform HACD activity in this tissue.

Our study identified a specific context of mitochondrial perturbation that suggests a direct role for cardiolipin in mitochondrial coupling efficiency. We measured normal V_0 (i.e., O_2 consumption without ADP), which ruled out canonical uncoupling via increased proton leakage through the IMM. Furthermore, careful analysis of respiratory parameters observed in *Hacd1*-KO mice revealed normal activity of the respiratory chain (i.e., of complexes I to IV) and analysis of ATP synthase oligomerization and ADP kinetics identified no change in *Hacd1*-KO mice compared to WT. The molecular mechanism that leads to a decreased phosphorylation capacity in mitochondria of HACD1-deficient muscles is therefore based neither on the classical uncoupling mechanism nor on the defective functioning of the respiratory chain or ATP synthase. Cardiolipin has been proposed to favor strong cristae curvatures, assembly of tightly packed lipid-protein complexes (33, 34), and mitochondrial respiratory efficiency (11, 12, 14, 35). Contrarily to models completely lacking cardiolipin (33, 34), our model of *Hacd1* deficiency, with a halving of the cardiolipin content, preserved assembly of respiratory supercomplexes and ATP synthase oligomerization. However, the reduction in cardiolipin content was associated with a reduction in mitochondrial coupling efficiency, and our *in vitro* demonstration that the addition of cardiolipin rescued mitochondrial coupling of mitochondria isolated from *Hacd1*-deficient muscle confirms a direct role of cardiolipin in the ATP production efficiency (14, 35). Further exploration of respiratory parameters in this context would be instrumental in unraveling the molecular mechanisms underlying the contribution of cardiolipin to mitochondrial coupling. Among these is a possible role in facilitating the lateral transfer of protons from respiratory complexes to ATP synthase (36–40), enabled by the abundance and negative charge of cardiolipin (26). In parallel, several studies report transient binding of cardiolipin to ATP synthase that contributes to its efficiency, possibly through lubrication of the ATP synthase ring or facilitated proton translocation (14, 41). All of these data are consistent with previous observations postulating a local proton circuitry at the microdomain level within the IMM for the benefit of optimized ATP synthase efficiency (39, 42–44).

Overall, our data identify that the cardiolipin content of skeletal muscle governs the energy balance of the body and open up new insights into understanding the molecular mechanisms for efficient OXPHOS in the mitochondria. While future studies are warranted to support the potential of translation of this phenomenon, the mechanism that we have discovered is promising for the development of new strategies for the prevention or treatment of metabolic disorders.

MATERIALS AND METHODS

Mice

Experiments on mice were approved by the Anses/EnvA/Upec Ethics Committee (C2EA-16; approval numbers 11/11/15-2, 20/12/12-16, and 17-030), and all care and manipulations were performed in

accordance with national and European legislation on animal experimentation. The whole study was carried on male mice that were housed in stainless steel cages containing environmental enrichment, in rooms maintained at $22^\circ \pm 1^\circ\text{C}$ with an air change rate of 12 vol/hour and lit from 7 a.m. to 7 p.m. Food and water were given *ad libitum* unless otherwise stated. *Hacd1*-KO mice were generated as previously described (20). Food was either an ND [3188 kcal/kg from carbohydrates (64%), proteins (24%), and fat (12%); maintenance diet for mice #C1324, Altromin] or an HFD [5241 kcal/kg from fat (60%), carbohydrates (23%), and protein (17%); diet-induced obesity diet #C1090, Altromin]. Kcal% was related to metabolizable energy (calculated values). Mice assessed for body mass gain under ND or HFD were housed individually, and mice body mass and food intake were measured each week. Food efficiency was determined by dividing the body mass gain (mg) by the total calorie intake (kcal). Mice were euthanized by cervical dislocation. The fast-twitch glycolytic superficial gastrocnemius, fast-twitch oxidative glycolytic (mixed) tibialis anterior, and the slow-twitch soleus muscle were used to provide a representative panel of muscles with different myofiber composition. In the whole study, BAT refers to interscapular BAT.

Spontaneous locomotor activity

Spontaneous locomotor activity was measured over a 12-hour night period using the Activmeter system (Bioseb). During the experiment, mice (4 to 5 months old) were individually caged with food and water provided *ad libitum*. The system allowed to quantify movements of the animal (distance, duration, slow versus fast movements, and average speed of the animal when it is in motion) and the time and duration of immobility. After a 24-hour period of acclimation, locomotor activity was recorded during four consecutive nights.

Treadmill test

The running capacity was evaluated on a treadmill (Tecmachine, Medical Development) at a 4% slope. All mice (4 to 5 months old) were initially acclimatized to the treadmill for 5 days (10 min/day and 12 m/min). The maximal aerobic speed was determined by challenging mice to an exercise of progressively increased intensity. Speed was increased every 2 min and the speed of the last completed running step before exhaustion was considered as the individual maximal aerobic speed. Endurance capacity was determined by challenging mice to a submaximal exercise intensity (60% of the maximal aerobic speed) until exhaustion.

Blood lactate concentration

A droplet of capillary blood was produced through incision of the tip of the tail. The tail and the droplet were brought close to the tip of the sensor so that the blood was absorbed and reached the measurement chamber of a LactateScout+ device (EKF Diagnostics, Germany).

Glucose tolerance test

The glucose tolerance test was performed in mice (7 months old) fasted overnight for 16 hours before an intraperitoneal injection of a 40% glucose in normal saline solution at a dose of 3 g of glucose per kilogram of body mass for ND-fed mice or glucose (1 g/kg) for HFD-fed mice. Blood was sampled from the tail vein just before the injection (T_0) and then after 30, 60, 90, and 120 min to assay blood glucose concentration (glycemia; Contour XT glucometer; Bayer).

Indirect calorimetry study

Mice (4 months old) were individually housed 14 days before and presented with training bottle and acclimated to the chambers for 48 hours before experimental measurements. For the experiment, they were fed 7 days with ND and then 7 days with HFD. They were analyzed for whole energy expenditure, oxygen consumption and carbon dioxide production, RQ (VCO_2/VO_2), food intake, and locomotor activity (beam breaks per hour) using a calorimetric device (LabMaster, TSE Systems GmbH). Data were recorded every 15 min for each animal during the entire experiment. Data analysis was performed on excel XP using extracted raw value of VO_2 consumed, VCO_2 production (expressed in milliliter per hour), and energy expenditure (kilocalories per hour). Subsequently, each value was normalized to the whole lean body mass extracted from the EchoMRI (Whole Body Composition Analyzers, EchoMRI, Houston, TX, USA) analysis as previously described (45). No practical method of estimation of the basal metabolism is available presently. However, an estimation could be made from windows of time during which animals should have no access to food, their previous intake had been far enough in time to discard the thermic effect of food, and the spontaneous activity had been the lowest possible within the past 30 min. Data points of energy expenditure were considered as the best estimation of basal metabolism when the spontaneous activity was lower, within the last 30 min, than 5% of the highest daily value and when no intake was recorded within the last 60 min. Fatty acid oxidation was calculated from the following equation: fat ox (kcal/hour) = energy expenditure (kcal/hour) \times (1-RER/0,3) according to (46).

Echocardiography

Mice (7 months old) were trained to be grasped because transthoracic echocardiography was performed in nonsedated mice to avoid any cardiac depressor effect of anesthetic agents. Typical heart rates at recording were above 600 beats per minute (bpm). Mice were carefully caught by the left hand and placed in supine position. Images were acquired from a parasternal position at the level of the papillary muscles using a 13-MHz linear-array transducer with a digital ultrasound system (Vivid 7, GE Medical System, Horton, Norway). Left ventricular (LV) diameters and anterior and posterior wall thicknesses were serially obtained from M-mode acquisition. As we expected a homogenous function and planned to compare sequential echocardiography, we used M-mode technique to assess both LV volumes, mass, and ejection fraction. Relative LV wall thickness was defined as the sum of septal and posterior wall thickness over LV end-diastolic diameter, and LV mass was determined using the uncorrected cube assumption formula [$LV\ mass = (AWT \cdot d \cdot LVEDD \cdot PWTD)^3 - (LVEDD)^3$]. Diastolic function was not assessed by echocardiography because of the heart rate above 600 bpm precluding the analysis of transmitral flow. Therefore, we assessed relaxation by dP/dt_{min} during in vivo hemodynamic analysis. Peak systolic values of radial Strain rate (SR) in the anterior and posterior wall were obtained using tissue Doppler imaging (TDI) as previously described (47). TDI loops were acquired from the same parasternal view with a careful alignment with the radial component of the deformation (48) at a mean frame rate of 514 frames per second and a depth of 1 cm. The Nyquist velocity limit was set at 12 cm/s. Radial SR analysis was performed offline using the EchoPac Software (GE Medical Systems) by a single observer (G.D.) blinded to the genotype of the animals. Peak systolic of radial SR was computed from a region of

interest positioned in the mid-anterior wall and was measured over an axial distance of 0.6 mm. The temporal smoothing filters were turned off for all measurements. Because slight respiratory variations exist, we averaged peak systolic of radial SR on eight consecutive cardiac cycles. The intra-observer variability of radial SR was assessed (G.D.) using the same acquisition and same method at 24-hour intervals [$3.5 \pm 3.4\%$ (3.3 to 3.7)].

Extraction of total RNA, RT-PCR, and RT-qPCR analyses

Samples from 4-month-old mice were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Total RNAs were isolated using TRIzol reagent (Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's protocol. Purity of RNAs was assessed by a ratio of absorbance at 260 and 230 nm > 1.7 . RNA quality was checked on agarose gel. One microgram of RNA was used for reverse transcription with the Maxima First Strand complementary DNA (cDNA) Synthesis Kit for reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) (Fermentas). cDNAs were amplified using the Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2 \times ; Fermentas). qPCR reactions were performed on a Roche Light Cycler system (Roche). All PCR and qPCR products were examined qualitatively on agarose gels. All presented RT-qPCR results were normalized by the geometrical mean of three independent reference genes (*Ywhaz*, *Polr2a*, and *Rplpo*), as previously described (49). Sequences of primers are listed in table S6.

Western blot experiments

Frozen tissues from 4- to 7-month-old mice were lysed in RIPA lysis buffer [50 mM tris-HCl (pH 8), 150 mM NaCl, 1% Triton X-100, 1 mM EDTA, 0.1% SDS, and 0.5% deoxycholic acid], supplemented with a cocktail of protease and phosphatase inhibitors (Pierce), using a Precellys homogenizer (Bertin). Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce). Protein extracts (20 μg) from superficial gastrocnemius muscles of 6-month-old WT and *Hacd1*-KO mice were loaded on Bolt 4 to 12% bis-tris gels (Invitrogen), separated for 22 min at 200 V and subsequently transferred to polyvinylidene difluoride membranes using transfer stack and iblot2 system for 7 min at 20 V (Invitrogen). Thereafter, blots were blocked for 60 min in 1.25% gelatin in tris-buffered saline with Tween 20 at room temperature, followed by incubation with different primary antibodies [phospho-AMPK, AMPK, and CS from Cell Signaling; ATP5A from Abcam; VDAC (custom-made gift from C. Lemaire, INSERM U1180)], overnight at 4°C . After washing, membranes were incubated with the appropriate secondary antibodies for 60 min at room temperature and revealed using the West Femto chemiluminescent substrate (Pierce). Light emission was recorded using a chemiluminescent detection system (G-Box, Syngene) and quantified by the ImageJ software [v1.47, National Institutes of Health (NIH)]. Protein content was normalized to β -actin (Antibody from Santa Cruz Biotechnology).

Proteomic analyses

Muscle lysates of tibialis anterior from 4-month-old mice were loaded on a gel, and each lane of gel was cut and washed for 15 min with an acetonitrile (ACN)/100 mM ammonium bicarbonate mixture (1:1). Digestion was performed in 50 mM ammonium bicarbonate (pH 8.0) and the quantity of modified trypsin (Promega, sequencing grade) was 0.1 μg per sample. Digestion was achieved for 6 hours at 37°C . The supernatant was conserved. Peptides were extracted by 5% formic acid in water/ACN (v/v). Supernatant and

extract tryptic peptides were dried and resuspended in 20 μl of 0.1% (v/v) trifluoroacetic acid (TFA). High-performance liquid chromatography was performed on an Ultimate 3000 LC system (Dionex). A 4- μl sample was loaded at 20 $\mu\text{l}/\text{min}$ on a precolumn cartridge [stationary phase: C18 PepMap 100, 5 μm ; column: 300- μm inside diameter (i.d.), 5 mm; Dionex] and desalted with 0.08% TFA and 2% ACN. After 4 min, the precolumn cartridge was connected to the separating PepMap C18 column (stationary phase: C18 PepMap 100, 3 μm ; column: 75- μm i.d., 150 mm; Dionex). Buffers were 0.1% HCOOH and 2% ACN (A) and 0.1% HCOOH and 80% ACN (B). The peptide separation was achieved with a linear gradient from 0 to 36% B for 18 min at 300 nl/min . Including the regeneration step at 100% B and the equilibration step at 100% A, one run took 50 min. Eluted peptides were analyzed online with a LTQ-Orbitrap mass spectrometer (MS; Thermo Electron) using a nanoelectrospray interface. Ionization (1.35-kV ionization potential) was performed with liquid junction and a capillary probe (10- μm i.d.; New Objective). Peptide ions were analyzed using Xcalibur 2.07 with the following data-dependent acquisition steps: (i) full MS scan in Orbitrap [mass-to-charge ratio (m/z) 300 to 1600, profile mode] and (ii) MS/MS in linear Trap (q_z , 0.25; activation time, 30 ms; and collision energy, 35%; centroid mode). Step 2 was repeated for the four major ions detected in step 1. Dynamic exclusion time was set to 60 s. A database search was performed with XTandem (X! tandem CYCLONE version 2010.12.01.1, <http://thegpm.org/TANDEM/>). Enzymatic cleavage was declared as a trypsin digestion with one possible miss cleavage. Cys carboxyamidomethylation and Met oxidation were set to static and possible modifications, respectively. Precursor mass and fragment mass tolerance were 10 parts per million and 0.5 Da, respectively. A refinement search was added with similar parameters except that semi-trypsin peptide and possible N-terminal proteins acetylation were searched. Few databases were used: the *Mus musculus* database (49,728 entries, version March 2011 from Uniprot), contaminant database (trypsin, keratins...). Only peptides with an *E* value smaller than 0.1 were reported. Identified proteins were filtered and grouped using XTandem Pipeline (version 3.1.4) (<http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline/>) according to: (i) A minimum of two different peptides was required with an *E* value smaller than 0.05 and (ii) a protein *E* value (calculated as the product of unique peptide *E* values) smaller than 10^{-4} . To take redundancy into account, proteins with at least one peptide in common were grouped. This allowed grouping proteins of similar function. Within each group, proteins with at least one specific peptide relatively to other members of the group were reported as subgroups. Gene Ontology analysis and protein set enrichment statistical analyses were performed using the PANTHER (Protein ANnotation THrough Evolutionary Relationship) classification system [www.pantherdb.org; (24)].

ATP quantification

Muscle ATP content was quantified using the CLSII kit (Sigma-Aldrich). Mice (4 to 5 months old) were euthanized immediately after a submaximal treadmill exercise of 40 min at 19 m/min and 4% slope, and tibialis anterior muscle was removed and snap-frozen in liquid nitrogen. Frozen tissues were weighted, minced with scissors, and homogenized in the lysis buffer provided in the kit using a Dounce homogenizer. Homogenates were centrifuged at 15,000g for 10 min and supernatants diluted 50:50 in the dilution buffer provided by the kit. ATP quantitation was performed according to

the manufacturer's instructions. For each sample, ATP concentration was normalized to the total protein content assessed with the bicinchoninic acid assay (Pierce).

Isolation of skeletal muscles mitochondria and respiration measurement

Tibialis anterior muscles were quickly collected after euthanasia of mice (8 months old) in ice-cold phosphate-buffered saline (PBS) (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10 mM EDTA; muscle samples were then minced with scissors, rinsed, and incubated in 5 ml of ice-cold PBS supplemented with 10 mM EDTA and 0.05% trypsin for 30 min, followed by a centrifugation at 200g for 5 min. Pellets were suspended in isolation buffer 1 [67 mM sucrose, 50 mM KCl, 10 mM EDTA, 0.2% bovine serum albumin (BSA), and 50 mM tris-HCl (pH 7.4)] and homogenized with a Dounce homogenizer (Sigma-Aldrich). Mitochondria were purified by a differential centrifugation at 700g for 10 min, and mitochondria-containing supernatants were then centrifuged at 8000g for 10 min. The crude mitochondrial pellet was resuspended in an appropriate volume of isolation buffer 2 [250 mM sucrose, 3 mM EGTA, and 10 mM tris-HCl (pH 7.4)]. Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce). The mitochondrial oxygen consumption flux was measured as previously described (50) at 37°C using 500 μg of crude mitochondria proteins diluted in 3 ml of mitochondrial respiration buffer [250 mM sucrose, 20 μM EGTA, 2 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , and 10 mM tris-HCl (pH 7.4)] in an oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments). The oxygen consumption rate was measured using 4 mM malate plus either 1 mM pyruvate and/or 1 mM pyruvate and 15 mM succinate. Oxygen consumption was assessed in the phosphorylating state with 4 mM ADP or in the nonphosphorylating state by adding oligomycin (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Respiration was uncoupled by successive addition of carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) up to 5 μM to reach maximal respiration.

Measurement of ATP synthesis flux

Isolated mitochondria (65 $\mu\text{g}/\text{ml}$) from 4-month-old mice were re-suspended in the mitochondrial respiration buffer (see above). After addition of ADP (4 mM), pyruvate (10 mM), glutamate (5 mM), and malate (5 mM), the oxygen consumption and ATP synthesis rates were both measured. Aliquots were collected every 60 s and precipitated in 7% HClO_4 /25 mM EDTA, centrifuged at 16,000g for 5 min and then neutralized with 2 M KOH and 0.3 M MOPS. The ATP content in these samples was determined using the CLSII kit (Sigma-Aldrich). In a parallel experiment, oligomycin (2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) was added to the mitochondrial suspension to determine the nonoxidative ATP synthesis rate.

Membrane potential measurement

The transmembrane potential variations ($\Delta\Psi$) were estimated in isolated mitochondria from 4-month-old mice from the fluorescence quenching of the lipophilic cationic dye rhodamine 123 using a Hitachi F7000 fluorimeter. Isolated mitochondria (65 μg of protein/ml) were incubated in the mitochondrial buffer [250 mM sucrose, 20 μM EGTA, 2 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , and 10 mM tris-HCl (pH 7.4)] containing pyruvate (10 mM), glutamate (5 mM), malate (5 mM), and 0.66 μM of rhodamine 123 (Sigma-Aldrich), and thermostated at 37°C. When added, ADP was 1 mM and oligomycin was 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. The rhodamine 123 fluorescence signal at each steady state (*F*) was recorded using an excitation wavelength of 485 nm,

and fluorescence emission was continuously detected at 500 nm. At the end of each experiment, the maximum fluorescence signal (F_{\max}) was monitored after complete de-energization of the mitochondria following addition of FCCP (6 μM). Then, the $F_{\max} - F/F_{\max}$ difference at each steady state was calculated.

NAD (P)H/NAD (P)⁺ redox measurement

Isolated mitochondria (100 μg of protein/ml) from 4-month-old mice were incubated in the mitochondrial buffer [250 mM sucrose, 20 μM EGTA, 2 mM KH_2PO_4 , 1 mM MgCl_2 , and 10 mM tris-HCl (pH 7.4)] thermostated at 37°C. When added, pyruvate was 10 mM, glutamate 5 mM, malate 5 mM, ADP 4 mM, and cyanide 4 mM. The NAD (P)H autofluorescence signal at each steady state (F) was recorded using an excitation wavelength of 340 nm, and fluorescence emission was continuously detected at 450 nm. At the end of each experiment, the maximum fluorescence signal (F_{\max}) was monitored after complete reduction within the NAD (P)H/NAD (P)⁺ couple following addition of cyanide. The fluorescence signal recorded in the presence of mitochondria alone without respiratory substrate was used as the 0% reduction state for the NAD (P)H/NAD (P)⁺ couple. NAD (P)H/NAD (P)⁺ ratio was expressed as a percentage of reduction according to the following formula: % reduction = $(F - F0\%) / (F100\% - F0\%) \times 100$.

Mitochondrial isolation from heart

Mice (8 months old) were euthanized, and hearts were quickly collected in ice-cold PBS (Thermo Fisher Scientific) supplemented with 10 mM EDTA; heart samples were then transferred into isolation buffer [310 mM sucrose, 20 mM tris-HCl, and 1 mM EGTA (pH 7.2)], minced with scissors and homogenized with a Dounce homogenizer (Sigma-Aldrich). Mitochondria were purified by a differential centrifugation at 1200g for 10 min, and mitochondria-containing supernatants were then centrifuged at 12,000g for 10 min. The crude mitochondrial pellet was resuspended in an appropriate volume of isolation buffer. Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce).

Permeabilized muscle fibers respiration

The mitochondrial respiration was studied *in vitro* in saponin-skinned fibers as previously described (51). Briefly, fibers from 4-month-old mice were separated under a binocular microscope in solution S (see below) on ice and then permeabilized in solution S containing saponin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 30 min at 4°C. After being placed 10 min in solution R (see below) to wash out adenine nucleotides and creatine phosphate, skinned separated fibers were transferred in a 3-ml water-jacketed oxygraphic cell (Strathkelvin Instruments) equipped with a Clark electrode, as previously described (51), under continuous stirring. Solution S contained: 2.77 mM CaK_2EGTA , 7.23 mM K_2EGTA , 20 mM taurine, 0.5 mM dithiothreitol (DTT), 20 mM imidazole, 50 mM potassium-methane sulfonate, 5.7 mM Na_2ATP , 15 mM creatine phosphate (final solution: pH 7.1, 160 mM ionic strength, 100 nM free Ca^{2+} , and 1 mM free Mg^{2+}). Solution R contained 2.77 mM CaK_2EGTA , 7.23 mM K_2EGTA , 20 mM taurine, 0.5 mM DTT, 20 mM imidazole, 3 mM phosphate, 90 mM potassium-methane sulfonate, 10 mM sodium-methane sulfonate, and fatty acid-free BSA (2 mg/ml), [final solution: pH 7.1, 160 mM ionic strength, 100 nM free Ca^{2+} , and 1 mM free Mg^{2+}]. After the experiments, fibers were harvested and dried, and respiration rates were expressed as micromoles of O_2 per minute and per gram of dry mass.

Measurement of the maximal muscular oxidative capacities

After the determination of basal respiration rate measured at 22°C with R solution plus 1 mM pyruvate and 4 mM malate as mitochondrial substrates (V_0 , nonphosphorylating rate), fibers were exposed to an increasing concentration of ADP to determine the apparent Michaelis-Menten constant (Km) for ADP and maximal mitochondrial respiration [at saturating concentration of ADP (2 mM) V_{\max} , phosphorylating rate]. The ratio of V_{\max}/V_0 represented the degree of coupling between oxidation and phosphorylation of ADP for pyruvate.

Measurement of the respiratory chain complexes

While V_{\max} was being recorded, electron flow went through complexes I, III, and IV. Then, 4 min after this V_{\max} measurement, complex II was stimulated with succinate (15 mM) (complexes I, II, III, and IV). Complex I was then blocked with amytal (2 mM). Under these conditions, mitochondrial respiration was evaluated by complexes II, III, and IV.

Measurement of mitochondrial substrate utilization

Experiments were started in solution R plus 4 mM malate, 2 mM carnitine, and 0.1 mM palmitoyl-CoA (PCoA). After the determination of basal respiration rate V_0 , the maximal fiber respiration rate of PCoA was measured in the presence of a saturating ADP concentration (2 mM). Then, substrates were sequentially added every 3 to 4 min as follows: 0.1 mM octanoate, 1 mM pyruvate, and 15 mM succinate. The ratio PCoA/ V_0 corresponded to the degree of coupling between oxidation and phosphorylation for this substrate.

Supramolecular organization of mitochondrial respiratory chain complexes

For blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE), 75 μg of isolated mitochondria from the tibialis anterior muscle was incubated with digitonin extraction buffer [Hepes (30 mM), potassium acetate (150 mM), glycerol (12%), 6-aminocaproic acid (2 mM), EDTA (2 mM), and 6 g of high-purity digitonin per gram protein of mitochondria (pH 7.2)], and vortexed 1 hour at 4°C to solubilize membrane proteins. After incubation, solubilized extracts were centrifuged at 30,000g during 20 min, and supernatant are then mixed with loading dye [0.0125% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G-250]. Native complexes were resolved using bis-tris Invitrogen Novex NativePAGE 3 to 12% acrylamide gradient. OXPHOS complexes were visualized after in-gel activity (IGA) assays as described previously (52). Briefly, native gel was washed in potassium phosphate buffer (50 mM, pH 7.2) and then incubated in potassium phosphate buffer containing iodinitrotetrazolium (1 mg/ml), and NADH [400 μM (pH 7.2)] for Complex I. For Complex IV IGA assays, native gels were incubated in respiratory buffer [120 mM sucrose, 50 mM KCl, 20 mM tris-base, 4 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgCl_2 , and 1 mM EGTA (pH 7.2)] containing diaminobenzidine (1 mg/ml) and bovine cytochrome *c* (0.5 mg/ml). Coomassie staining was performed following the “PageBlue protein staining” (Fermentas) recommendations. BN-PAGE IGAs were collected using the Amersham ImageQuant 800 (GE Healthcare).

ATP synthase oligomerization

Three independent preparations of mitochondria isolated from the tibialis anterior muscle of 6-month-old WT and *Hacd1*-KO mice were resuspended at a protein concentration of 10 mg/ml in extraction buffer [150 mM potassium acetate, 15% (w/v) glycerol, 2 mM ϵ -amino caproic acid, and 30 mM Hepes (pH 7.4)] in the presence of protease inhibitors (Complete, Roche) and 1.5% digitonin (w/v). After an incubation of 30 min at 4°C, samples were centrifuged at

25,000g for 30 min at 4°C. Ten microliters of supernatant was mixed with 1 µl of 0.0125% (w/v) SERVA blue G and loaded on 3 to 12% bis-tris native gel (Novex, Life Technologies). Anode buffer was prepared with a 20-fold dilution of Novex running buffer, and light blue cathode buffer was obtained by a 200-fold dilution of Novex cathode additive in anode buffer. Gels were run at 150 V for 120 min and ATPase activities were revealed in gel.

Measurement of fatty acid oxidation

Gastrocnemius muscles from 12-month-old mice were finely chopped in 2 ml of Krebs-Henseleit bicarbonate medium (pH 7.4) and then incubated in Erlenmeyer flasks containing a final volume of 25 ml of the same medium. Flasks were maintained at 37°C in an oxygenated atmosphere (O₂/CO₂, 95/5). For fatty acid oxidation determination, 1 pCi of ¹⁴C-linoleate was added to the medium and the flask was hermetically sealed with rubber caps with centrally inserted plastic wells. After 20 to 30 min of incubation, 0.4 ml of 40% (w/v) HClO₄ was added through the rubber cap, and 0.4 ml of 1 M solution of hyamine hydroxide was deposited in the center of the well. The flasks were then shaken at room temperature for 1 hour. The radioactivity present in the center wells (corresponding to the formed CO₂) was determined and the flask content was harvested and centrifuged at 700g for 15 min. The resulting supernatant was neutralized with KOH (5 M), and total ¹⁴C-labeled acid-soluble products were counted. Total fatty acid oxidation corresponded to the sum of the catabolism of labeled linoleate into CO₂ and acid-soluble products.

Mitoplast preparation

Freshly isolated mitochondrial pellets were incubated in 1 ml of H300 Mitoplast buffer [70 mM sucrose, 220 mM mannitol, and 2 mM Hepes (pH 7.4)] supplemented with 0.05% BSA and 0.12 µg of digitonin per microgram of mitochondrial protein, for 15 min at 4°C, with gentle shaking. Mitochondria were centrifuged at 8000g for 5 min and pellets were incubated in 1 ml of H40 Mitoplast buffer (H300 buffer diluted 7.5× in distilled water) for 15 min at 4°C, with gentle shaking. Suspension was then homogenized with a Dounce homogenizer (Sigma-Aldrich) and centrifuged at 8000g for 5 min. Pellets were resuspended in 1 ml of H40 buffer and centrifuged at 8000g for 5 min. Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce).

Physical properties of mitochondrial membranes (TMA-DPH decay fluorescence)

TMA-DPH (Sigma-Aldrich) was used to monitor physical properties of mitochondrial membranes of 7- to 8-month-old mice. TMA-DPH is composed of a cationic substitute (TMA) that anchors at the polar heads of the membrane, while allowing the fluorescent hydrophobic probe DPH to be located in nonpolar regions. To limit fluorescent noise, mitoplasts were resuspended in the hypotonic buffer [9 mM sucrose, 29 mM mannitol, 0.3 mM Hepes (pH 7.4)] as described hereafter.

Experiments were repeated five times using independent samples, each from different mice. Decay-fluorescence measurements were performed on each sample at 37°C after a measurement of the instrumental response of the spectrofluorimeter used to measure fluorescence decay (“prompt”). Thirty microliters of sample [optical density (OD)₆₀₀ = 0.055] diluted in 2.97 ml of hypotonic buffer was introduced into spectroscopic quartz cuvette with an optical path length of 1 cm (VWR International).

Fluorescence decay was measured by the time-correlated single-photon counting (TCSPC) method using a Horiba-Fluoromax-4 spectrofluorimeter (Horiba) equipped with a 370-nm laser diode (NanoLED C2, Horiba) as the source of excitation. Fluorescence decays were measured in TCSPC setup (Deltahub, Horiba). The instrument response function was about 160 ps (measured at 370 nm using the hypotonic buffer). Emission and excitation wavelength of TMA-DPH were fixed at 370 nm and 431 ± 1.1 nm, respectively. Each decay curve corresponded to 10,000 counts.

Quantitative investigation of fluorescence decay of TMA-DPH Curve smoothing

For illustration purposes, we smoothed the decay for the representative experiments using the generalized additive model of R statistical package “mgcv” with a Gaussian link and a *P*-spline smooth term. This smoothing was not used for the subsequent modeling steps below.

Finite exponential mixture model

We modeled the fluorescence decay obtained from the lipidomic analyses of mitoplasts using finite exponential mixtures (28). We accounted for the artifacts of the measuring apparatus by convolving the mixtures with the instrumental response (or “prompt”). The model was composed of $2N$ parameters, with N being the number of exponentials (each exponential has a scale and a characteristic time). We did not find it necessary to account for neither a potential time shift nor for background noise with an additional constant, as those additions did not improve the fit. More specifically, let $P(i)$ be the “prompt” (instrumental response) and $Y(i)$ the “decay” (experimental response) for channel i . The times of measurement are δ_i , with δ being the time interval between channels. The decay $G(t)$ at time t is given by a mixture of exponentials with characteristic times τ_k and scaling parameters C_k (\mathcal{H} is the Heaviside function)

$$G(t) = \mathcal{H}(t) \sum_k C_k e^{-t/\tau_k}$$

Convolving with the prompt response $P(i)$ gives the model, with $B_k = \delta C_k$ scaling parameters

$$F(i) = \sum_{j=0}^{\infty} P(j) \mathcal{H}(t) \sum_k B_k e^{-\delta(i-j)/\tau_k}$$

For the optimization procedures, we reparametrized the τ_k to $\theta_k = \log \tau_k$.

Nonlinear mixed-effects models

To compare mixing proportions and characteristic times of decay, we used various nonlinear mixed-effects models (NLME) (see listing S1): first, a baseline NLME for the inner membrane that did not discriminate WT and *Hacd1*-KO (model A); second, two models where either the mixing proportions or the characteristic times of decay alone could vary between WT and *Hacd1*-KO (models B1 and B2, respectively); last, one model where both the mixing proportions and characteristic times were allowed to differ (model C).

More specifically, the mice phenotype (WT or *Hacd1*-KO) was encoded in a categorical factor with the following contrast matrix

$$L = \begin{pmatrix} & \text{Hacd1-KO} & \text{WT} \\ \text{intercept} & 1 & 0 \\ \text{WT} & -1 & 1 \end{pmatrix}$$

For instance, the mean θ_1 for population *Hacd1*-KO is the intercept, and the mean θ_1 for population WT is (intercept) + (WT).

Model fitting

We fitted the model through either a weighted nonlinear least-squares method at the experiment level or NLME with potential linear regressors for the fixed parameters.

Statistical analysis

For model comparison, we performed an analysis of variance (ANOVA), privileging the reading of the Akaike's information criterion (AIC) over that of the Bayesian information criterion and the *P* value of the log likelihood ratio (53).

Workflow

First, we determined the number of exponentials to use by comparing the AIC between potential models and whether models converged when fitted through a Levenberg-Marquardt nonlinear least-squares method. Then, we determined the appropriate random-effects structure and heteroscedasticity correction for NLME modeling by assessing convergence, AIC, within-experiment and between-experiment heteroscedasticity for various combinations. Last, we added a linear dependence of (some of) the fixed effects to a dummy variable *WT/Hacd1-KO* and assessed the statistical significance of this addition with an ANOVA.

Software implementation

The model is implemented in C++ using the Armadillo library for linear algebra and uses Armadillo's fast Fourier transform to perform the discrete convolution with the instrumental response. Both the optimization and analysis were made in the R statistical language with the package "nlme." All the codes are made available at github.com/ProLaLab/ProLa2020.Sci.Adv with the appropriate tests and reproducible workflow (in addition, the releases are archived at <https://doi.org/10.5281/zenodo.1228112>). The raw data are available upon request at <https://doi.org/10.5281/zenodo.4046133>.

Lipidomic analyses

Mice (4 months old) were euthanized, and mitochondria were isolated from tibialis anterior muscles as described above and immediately frozen in liquid nitrogen and protected from oxidation by a layer of argon gas and stored at -80°C until analysis. Quantitation of fatty acids and glycerophospholipids contents was performed as previously described for myoblasts (20, 54). Phospholipid species representation was performed as described hereafter. Briefly, total phospholipid amount was determined with Corona CAD detection by calculating the concentration of each phospholipid class (in microgram/ml) compared to calibration ranges of commercial standards. Chromatographic system from Thermo Fisher Scientific included a Dionex U-3000 Rapid Separation Liquid Chromatography (RSLC) system with two quaternary pumps, an autosampler, and a column oven. The RSLC system was coupled online to a charged aerosol detector, Corona-CAD Ultra for the quantitative part of the study and: a LTQ-Orbitrap Velos Pro for the lipidomic study (all from Thermo Fisher Scientific). Liquid chromatography, mass spectrometry, phospholipid species identification, and phospholipid species representation were performed as previously described (55). Statistical analysis was performed using multiple pairwise tests according to the Holm-Bonferroni method.

Mitochondrial phospholipids enrichment

Isolated mitochondria (500 μg) from 4-month-old mice were incubated in fusion buffer [220 mM mannitol, 70 mM sucrose, 2 mM Hepes, 10 mM KH_2PO_4 , 5 mM MgCl_2 , 1 mM EGTA, 10 mM glutamate, 2 mM malate, 10 mM pyruvate, and 2.5 mM ADP (pH 6.5)]

for 20 min at 30°C under constant stirring agitation in the presence of 15 nmol of small unilamellar vesicles (SUVs), prepared as previously described (56), and using natural or fluorescent phospholipids (Avanti Polar Lipids). After fusion, mitochondria were layered on a sucrose gradient (0.6 M) and centrifuged 10 min at 10,000g at 4°C to remove SUV. Pellet was then washed in mitochondrial buffer 2 [250 mM sucrose, 3 mM EGTA, and 10 mM tris-HCl, (pH 7.4)]. Confocal images were acquired with a Zeiss LSM800 confocal (Zeiss).

NAO quantification

Isolated mitochondria or mitoplasts (100 μg of proteins) from 4-month-old mice were fixed in 2% formaldehyde for 15 min, centrifuged at 10,000g for 10 min and rinsed with PBS. The pellet was then resuspended and incubated 10 min at room temperature in 100 μl of PBS supplemented with 35 μM of NAO. Mitochondria or mitoplasts were then centrifuged at 10,000g for 10 min, and pellets were resuspended in 100 μl of PBS and fluorescence (λ excitation, 495 nm; λ emission, 620 nm) was acquired in 96-well plates with a spectrofluorimeter (TECAN infinite M200, TECAN, Austria).

Enzymatic assay

Complete enzymatic extractions from small pieces of frozen tissues from 4-month-old mice were obtained in an ice-cold buffer (1 ml for 50 mg of tissue) containing 5 mM Hepes (pH 8.7), 1 mM EGTA, 1 mM DTT, and 0.1% Triton X-100, using a Precellys homogenizer (Bertin), by two cycles of 8 s at 6500 rpm. Protein concentration was assessed using the bicinchoninic acid assay (Pierce). Total activity of COX and CS, were assayed at 30°C (pH 7.5), using standard spectrophotometric assays (57). Total activities of aconitase and fumarase were assayed from mitochondrial extracts at 30°C (pH 7.5), using standard spectrophotometric assays (58).

Protein carbonylation

Muscle carbonylation of proteins was quantified using the Oxyblot Protein Oxidation Detection Kit (Millipore). Briefly, protein lysates from the superficial gastrocnemius muscle of 4-month-old mice were prepared as for Western blots and treated to derivatize carbonyl groups according to the manufacturer's instructions. Then, protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred to a nitrocellulose membrane, and incubated with the provided primary and secondary antibodies. Light emission was recorded using a chemiluminescent detection system (G-Box, Syngene) and quantified by the ImageJ software (v1.47, NIH). Membrane was stained with Coomassie Blue, and protein content was normalized to one band.

Histological staining

Tibialis anterior muscles from 7-month-old mice were snap-frozen in isopentane cooled in liquid nitrogen and then stored at -80°C . Ten-micrometer-thick transverse sections were stained for glycerol-3-phosphate dehydrogenase (GPDH), succinate dehydrogenase (SDH), and NADH dehydrogenase (NADH tetrazolium reductase reaction, NADH-TR) activity as previously described (59). Livers were frozen in OCT embedding medium (Tissue-Tek). Ten-micrometer-thick transverse sections were fixed for 30 min in Baker solution (136 mM CaCl_2 and 4% HCHO), rinsed with water, and then stained with Oil Red O (ORO) solution (12 mM ORO in 70% ethanol) for 5 min (liver) or 30 min (muscle). The adipose tissue from gonadal pads was fixed in 10% formalin for 48 hours and embedded in paraffin. Four-micrometer-thick transverse sections were stained with

hematoxylin-eosin. Images were captured using an Axio Observer Z1 microscope (Zeiss) and analyzed in a blinded manner using the ImageJ software (v1.47, NIH).

Electron microscopy

After euthanasia of 5- to 6-month-old mice, muscle tension and position were normalized by pinning the entire skinned hindlimb on a paraffin-coated dish, with the metatarsus making an angle of 90° with the tibia. The limb was then fixed with 2% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 7.2), at room temperature for 4 hours. Muscles were cut in small pieces and kept overnight in the same fixation buffer at 4°C. Samples were then processed at the Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods MIMA2 platform, INRAE. They were contrasted with 0.5% oolong tea extract in cacodylate buffer, postfixed with a solution of 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium cyanoferrate, and gradually dehydrated in ethanol (30 to 100%) and substituted gradually in a mix of propylene oxide-epon and embedded in Epon (Delta microscopy). Thin sections (70 nm) were collected onto 200-mesh copper grids, and counterstained with lead citrate. Grids were examined with a Hitachi HT7700 electron microscope operating at 80 kV (Elexience). Images were acquired with a charge-coupled device camera (AMT).

Data analysis

For cristae quantification, 20 images at ×12,000 magnification were analyzed per animal, and all visible cristae were assessed using the function plot profile on ImageJ (v1.47, NIH). Mean cristae width corresponded to the maximal diameter of the tubular part and was calculated for each crista of each analyzed mitochondrion. For each animal, a minimum of 100 cristae was measured for the superficialis gastrocnemius muscle and 800 cristae for the soleus muscle. All images were analyzed in a blinded manner.

Fecal lipids quantitation

One gram of feces was collected after 8 weeks of HFD (7-month-old mice) and powdered using a tissue grinder. The powder was resuspended in 5 ml of normal saline solution (0.9% NaCl) and lipids were extracted in a mixture of chloroform:methanol (2:1). The solution was centrifuged at 1000g for 10 min. Lipids collected in the lower phase were air dried and weighted.

Quantification and statistical analysis

All data are presented as mean of values measured on distinct samples ± SE. Data were analyzed using Sigma Stat (Sigma Stat, version 3.0, Systat Software, San Jose, CA, USA). Raw data from each individual experiment were evaluated using an unpaired two-tailed *t* test with 95% confidence. For datasets that did not pass the D'Agostino and Pearson omnibus normality test (α , 0.05), differences were evaluated using a two-tailed unpaired nonparametric Mann-Whitney test with 95% confidence. Multiple pairwise tests were corrected using the Holm-Bonferroni method. The results of indirect calorimetry are expressed as mean ± SEM. Variance equality was analyzed by *F* test, and comparisons between groups were carried out using ANOVA with food (ND or HFD) or phase (day or night) and genotype of mice (WT or *Hacd1*-KO mice) and their interactions as factors followed by post hoc Tukey test. Data of calorimetrics presented represent mean of at least 96 hours measurement. Differences between groups were considered significant if the *P* value was less than 0.05.

Key resources

A complete set of the reagents used in this study is available in table S7.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary material for this article is available at <http://advances.sciencemag.org/cgi/content/full/7/1/eabd6322/DC1>

[View/request a protocol for this paper from Bio-protocol.](#)

REFERENCES AND NOTES

1. L. M. Jaacks, S. Vandevijvere, A. Pan, C. J. McGowan, C. Wallace, F. Imamura, D. Mozaffarian, B. Swinburn, M. Ezzati, The obesity transition: Stages of the global epidemic. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **7**, 231–240 (2019).
2. J. Kerr, C. Anderson, S. M. Lippman, Physical activity, sedentary behaviour, diet, and cancer: An update and emerging new evidence. *Lancet Oncol.* **18**, e457–e471 (2017).
3. M. O. Goodarzi, Genetics of obesity: What genetic association studies have taught us about the biology of obesity and its complications. *Lancet Diabetes Endocrinol.* **6**, 223–236 (2018).
4. A. Chait, L. J. den Hartigh, Adipose tissue distribution, inflammation and its metabolic consequences, including diabetes and cardiovascular disease. *Front. Cardiovasc. Med.* **7**, 22 (2020).
5. D. A. Kass, P. Duggal, O. Cingolani, Obesity could shift severe COVID-19 disease to younger ages. *The Lancet* **395**, 1544–1545 (2020).
6. J. L. Kraschnewski, J. Boan, J. Esposito, N. E. Sherwood, E. B. Lehman, D. K. Kephart, C. N. Sciamanna, Long-term weight loss maintenance in the United States. *Int. J. Obes.* **34**, 1644–1654 (2010).
7. K. R. Westerterp, Physical activity, food intake, and body weight regulation: Insights from doubly labeled water studies. *Nutr. Rev.* **68**, 148–154 (2010).
8. Y.-H. Tseng, A. M. Cypess, C. R. Kahn, Cellular bioenergetics as a target for obesity therapy. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 465–482 (2010).
9. P. Mitchell, Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* **191**, 144–148 (1961).
10. S. Cogliati, J. A. Enriquez, L. Scorrano, Mitochondrial cristae: Where beauty meets functionality. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 261–273 (2016).
11. N. Ikon, R. O. Ryan, Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1859**, 1156–1163 (2017).
12. G. Paradies, V. Paradies, V. De Benedictis, F. M. Ruggiero, G. Petrosillo, Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim. Biophys. Acta* **1837**, 408–417 (2014).
13. M. Schlame, M. Ren, The role of cardiolipin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1788**, 2080–2083 (2009).
14. A. L. Duncan, A. J. Robinson, J. E. Walker, Cardiolipin binds selectively but transiently to conserved lysine residues in the rotor of metazoan ATP synthases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **113**, 8687–8692 (2016).
15. N. Ikon, R. O. Ryan, Barth syndrome: Connecting cardiolipin to cardiomyopathy. *Lipids* **52**, 99–108 (2017).
16. P. G. Barth, H. R. Scholte, J. A. Berden, J. M. V. D. K.-V. Moorsel, I. E. M. Luyt-Houwen, E. T. V. Veer-Korthof, J. J. V. D. Harten, M. A. Sobotka-Plojhar, An X-linked mitochondrial disease affecting cardiac muscle, skeletal muscle and neutrophil leucocytes. *J. Neurol. Sci.* **62**, 327–355 (1983).
17. V. Denic, J. S. Weissman, A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell* **130**, 663–677 (2007).
18. T. Sassa, A. Kihara, Metabolism of very long-chain fatty acids: Genes and pathophysiology. *Biomol. Ther.* **22**, 83–92 (2014).
19. M. Ikeda, Y. Kanao, M. Yamanaka, H. Sakuraba, Y. Mizutani, Y. Igarashi, A. Kihara, Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Lett.* **582**, 2435–2440 (2008).
20. J. Blondelle, Y. Ohno, V. Gache, S. Guyot, S. Storch, N. Blanchard-Gutton, I. Barthélémy, G. Walmsley, A. Rahier, S. Gadin, M. Maurer, L. Guillaud, A. Prola, A. Ferry, G. Aubin-Houzelstein, J. Demarquoy, F. Relaix, R. J. Piercy, S. Blot, A. Kihara, L. Tiret, F. Pilot-Storck, HADC1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *J. Mol. Cell Biol.* **7**, 429–440 (2015).
21. E. Muhammad, O. Reish, Y. Ohno, T. Scheetz, A. DeLuca, C. Searby, M. Regev, L. Benyamini, Y. Fellig, A. Kihara, V. C. Sheffield, R. Parvari, Congenital myopathy is caused by mutation of HADC1. *Hum. Mol. Genet.* **22**, 5229–5236 (2013).
22. M. Pelé, L. Tiret, J.-L. Kessler, S. Blot, J.-J. Panthier, SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Hum. Mol. Genet.* **14**, 1417–1427 (2005).
23. F. Al Amrani, C. Gorodetsky, L.-N. Hazrati, K. Amburgey, H. D. Gonorazky, J. J. Dowling, Biallelic LINE insertion mutation in *HADC1* causing congenital myopathy. *Neurol. Genet.* **6**, e423 (2020).

24. H. Mi, A. Muruganujan, J. T. Casagrande, P. D. Thomas, Large-scale gene function analysis with the PANTHER classification system. *Nat. Protoc.* **8**, 1551–1566 (2013).
25. J. A. Mayr, V. Havlíčková, F. Zimmermann, I. Magler, V. Kaplanová, P. Jesina, A. Pecinová, H. Nusková, J. Koch, W. Sperl, J. Houstek, Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3430–3439 (2010).
26. T. H. Haines, N. A. Dencher, Cardiolipin: A proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett.* **528**, 35–39 (2002).
27. G. Oemer, K. Lackner, K. Muigg, G. Krumschnabel, K. Watschinger, S. Sailer, H. Lindner, E. Gnaiger, S. B. Wortmann, E. R. Werner, J. Zschocke, M. A. Keller, Molecular structural diversity of mitochondrial cardiolipins. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **115**, 4158–4163 (2018).
28. C. D. Stubbs, C. Ho, S. J. Slater, Fluorescence techniques for probing water penetration into lipid bilayers. *J. Fluoresc.* **5**, 19–28 (1995).
29. H. Schneider, J. J. Lemasters, M. Höchli, C. R. Hackenbrock, Liposome-mitochondrial inner membrane fusion. Lateral diffusion of integral electron transfer components. *J. Biol. Chem.* **255**, 3748–3756 (1980).
30. J. Grundlingh, P. I. Dargan, M. El-Zanfaly, D. M. Wood, 2,4-Dinitrophenol (DNP): A weight loss agent with significant acute toxicity and risk of death. *J. Med. Toxicol.* **7**, 205–212 (2011).
31. R. J. Perry, D. Zhang, X.-M. Zhang, J. L. Boyer, G. I. Shulman, Controlled-release mitochondrial protonophore reverses diabetes and steatohepatitis in rats. *Science* **347**, 1253–1256 (2015).
32. B. Wang, J. Pelletier, M. J. Massaad, A. Herscovics, G. C. Shore, The yeast split-ubiquitin membrane protein two-hybrid screen identifies BAP31 as a regulator of the turnover of endoplasmic reticulum-associated protein tyrosine phosphatase-like B. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 2767–2778 (2004).
33. D. Acehan, A. Malhotra, Y. Xu, M. Ren, D. L. Stokes, M. Schlame, Cardiolipin affects the supramolecular organization of ATP synthase in mitochondria. *Biophys. J.* **100**, 2184–2192 (2011).
34. M. Zhang, E. Mileykovskaya, W. Dowhan, Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.* **280**, 29403–29408 (2005).
35. S. E. Gasanov, A. A. Kim, L. S. Yaguzhinsky, R. K. Dagda, Non-bilayer structures in mitochondrial membranes regulate ATP synthase activity. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* **1860**, 586–599 (2018).
36. D. A. Cherepanov, W. Junge, A. Y. Mulikdjanian, Proton transfer dynamics at the membrane/water interface: Dependence on the fixed and mobile pH buffers, on the size and form of membrane particles, and on the interfacial potential barrier. *Biophys. J.* **86**, 665–680 (2004).
37. C. Zhang, D. G. Knyazev, Y. A. Vereshaga, E. Ippoliti, T. H. Nguyen, P. Carloni, P. Pohl, Water at hydrophobic interfaces delays proton surface-to-bulk transfer and provides a pathway for lateral proton diffusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 9744–9749 (2012).
38. T. Nilsson, C. R. Lundin, G. Nordlund, P. Ådelroth, C. von Ballmoos, P. Brzezinski, Lipid-mediated protein-protein interactions modulate respiration-driven ATP synthesis. *Sci. Rep.* **6**, 24113 (2016).
39. A. Toth, A. Meyrat, S. Stoldt, R. Santiago, D. Wenzel, S. Jakobs, C. von Ballmoos, M. Ott, Kinetic coupling of the respiratory chain with ATP synthase, but not proton gradients, drives ATP production in cristae membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **117**, 2412–2421 (2020).
40. M. Y. Yoshinaga, M. Y. Kellermann, D. L. Valentine, R. C. Valentine, Phospholipids and glycolipids mediate proton containment and circulation along the surface of energy-transducing membranes. *Prog. Lipid Res.* **64**, 1–15 (2016).
41. A. Mühleip, S. E. McComas, A. Amunts, Structure of a mitochondrial ATP synthase with bound native cardiolipin. *eLife* **8**, (2019).
42. G. F. Azzone, T. Pozzan, E. Viola, P. Arslan, Proton electrochemical gradient and phosphate potential in submitochondrial particles. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **501**, 317–329 (1978).
43. P. Mitchell, A commentary on alternative hypotheses of protonic coupling in the membrane systems catalysing oxidative and photosynthetic phosphorylation. *FEBS Lett.* **78**, 1–20 (1977).
44. B. Rieger, W. Junge, K. B. Busch, Lateral pH gradient between OXPHOS complex IV and F₀F₁ ATP-synthase in folded mitochondrial membranes. *Nat. Commun.* **5**, 1–7 (2014).
45. A. Joly-Amado, R. G. P. Denis, J. Castel, A. Lacombe, C. Cansell, C. Rouch, N. Kassis, J. Dairou, P. D. Cani, R. Ventura-Clapier, A. Prola, M. Flamment, F. Fougelle, C. Magnan, S. Luquet, Hypothalamic AgRP-neurons control peripheral substrate utilization and nutrient partitioning. *EMBO J.* **31**, 4276–4288 (2012).
46. M. D. Bruss, C. F. Khambatta, M. A. Ruby, I. Aggarwal, M. K. Hellerstein, Calorie restriction increases fatty acid synthesis and whole body fat oxidation rates. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**, E108–E116 (2010).
47. G. Derumeaux, F. Ichinose, M. J. Raheer, J. G. Morgan, T. Coman, C. Lee, J. M. Cuesta, H. Thibault, K. D. Bloch, M. H. Picard, M. Scherrer-Crosbie, Myocardial alterations in senescent mice and effect of exercise training: A strain rate imaging study. *Circ. Cardiovasc. Imaging* **1**, 227–234 (2008).
48. V. Ferferieva, A. Van den Bergh, P. Claus, R. Jasaityte, A. La Gerche, F. Rademakers, P. Herijgers, J. D'hooge, Assessment of strain and strain rate by two-dimensional speckle tracking in mice: Comparison with tissue Doppler echocardiography and conductance catheter measurements. *Eur. Heart J. Cardiovasc. Imaging* **14**, 765–773 (2013).
49. J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, F. Speleman, Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* **3**, RESEARCH0034 (2002).
50. A. Mourier, B. Ruzzenente, T. Brandt, W. Kühlbrandt, N.-G. Larsson, Loss of LRPPRC causes ATP synthase deficiency. *Hum. Mol. Genet.* **23**, 2580–2592 (2014).
51. A. V. Kuznetsov, V. Veksler, F. N. Gellerich, V. Saks, R. Margreiter, W. S. Kunz, Analysis of mitochondrial function in situ in permeabilized muscle fibers, tissues and cells. *Nat. Protoc.* **3**, 965–976 (2008).
52. I. Wittig, H.-P. Braun, H. Schägger, Blue native PAGE. *Nat. Protoc.* **1**, 418–428 (2006).
53. K. P. Burnham, D. R. Anderson, *Model Selection and Multimodel Inference - A Practical* (Springer-Verlag New York, New York, 2002); <http://www.springer.com/us/book/9780387953649>.
54. J. Blondelle, J.-P. Pais de Barros, F. Pilot-Storck, L. Tiret, Skeletal muscle development, in *Methods in Molecular Biology*, J. Ryall, Ed. (Springer, 2017), vol. 1668, pp. 39–60.
55. M. Moulin, A. Solgadi, V. Veksler, A. Garnier, R. Ventura-Clapier, P. Chaminade, Sex-specific cardiac cardiolipin remodelling after doxorubicin treatment. *Biol. Sex Differ.* **6**, 20 (2015).
56. R. Mendez, S. Banerjee, Sonication-based basic protocol for liposome synthesis. *Methods Mol. Biol.* **1609**, 255–260 (2017).
57. F. Caffin, A. Prola, J. Piquereau, M. Novotova, D. David, A. Garnier, D. Fortin, M. Alavi, V. Veksler, R. Ventura-Clapier, F. Joubert, Altered skeletal muscle mitochondrial biogenesis but improved endurance capacity in trained OPA1-deficient mice. *J. Physiol.* **591**, 6017–6037 (2013).
58. J. Piquereau, F. Caffin, M. Novotova, A. Prola, A. Garnier, P. Mateo, D. Fortin, L. H. Huynh, V. Nicolas, M. V. Alavi, C. Brenner, R. Ventura-Clapier, V. Veksler, F. Joubert, Down-regulation of OPA1 alters mouse mitochondrial morphology, PTP function, and cardiac adaptation to pressure overload. *Cardiovasc. Res.* **94**, 408–417 (2012).
59. G. L. Walmsley, S. Blot, K. Venner, C. Sewry, J. Laporte, J. Blondelle, I. Barthélémy, M. Maurer, N. Blanchard-Gutton, F. Pilot-Storck, L. Tiret, R. J. Piercy, Progressive structural defects in canine centronuclear myopathy indicate a role for HADC1 in maintaining skeletal muscle membrane systems. *Am. J. Pathol.* **187**, 441–456 (2017).

Acknowledgments: We are grateful to C. Laisne and D. Gelperowicz for taking care of mice; J.-P. Pais de Barros and the LAP platform (Dijon, France) for lipidomic analyses; C. Longin and M. Lethuile for electron microscopy (Microscopy and Imaging Facility for Microbes, Animals and Foods MIMA2 platform, INRAE, Jouy-en-Josas, France); G. Delahaye, M.-P. Sellier, and C. Poncet for technical help; R. Ventura-Clapier for insightful discussions; and G. Walmsley for the edition of an interim version of the manuscript. We acknowledge the technical platform of metabolism of the Unit “Biologie Fonctionnelle et Adaptative” (University of Paris, BFA, UMR 8251 CNRS, Paris, France) for metabolic analysis and the animal core facility “Buffon” of the Université de Paris–Institut Jacques Monod for animal husbandry and the Plateau Technique d’Imagerie Spectroscopique (PIMS), which is a part of DimaCell platform (Université de Bourgogne–INRAE, Dijon, France). **Funding:** N.Kh.’s Ph.D. fellowship has been financially supported by the French “Fondation pour la Recherche Médicale” (FRM). The work was primarily supported by the French “Agence Nationale de la Recherche” (ANR-12-JSV1-0005) and the “Association Française contre les Myopathies” (AFM #16143, Translasmuscle I #19507, and Translasmuscle II #22946). **Author contributions:** Conceptualization, A.P., J.B., and F.P.-S.; methodology, A.P., S.G., A.S., N.Ko., G.D., M.-F.G., F.J., S.L., and F.P.-S.; formal analysis, A.P., J.B., A.V., J.P., R.G.P.D., S.G., A.Ma., M.M., C.H., N.Kh., C.G., T.M., G.C., L.G., M.G., A.S., J.C., J.T., J.D., A.Mo., G.D., and F.P.-S.; data curation, A.P., J.B., J.P., R.G.P.D., S.G., H.C., A.Ma., C.H., A.S., F.-D., J.D., A.Mo., N.Ko., G.D., M.-F.G., V.V., S.L., and F.P.-S.; figures conception, A.P., J.B., R.G.P.D., H.C., A.Mo., L.T., and F.P.-S.; writing, original draft, A.P., L.T., and F.P.-S.; review and editing, all authors; funding acquisition, F.R., L.T., and F.P.-S.; resources, J.P., R.G.P.D., S.G., H.C., A.Ma., J.D., A.Mo., N.Ko., M.-F.G., F.J., V.V., S.L., F.R., L.T., and F.P.-S.; supervision, A.P., F.R., L.T., and F.P.-S. **Competing interests:** The authors declare that they have no competing interests. **Data materials and availability:** All data needed to evaluate the conclusions in the paper are present in the paper and/or the Supplementary Materials. Additional data related to this paper may be requested from F.P.-S. (fanny.storck@vet-alfort.fr).

Submitted 8 July 2020

Accepted 4 November 2020

Published 1 January 2021

10.1126/sciadv.abd6322

Citation: A. Prola, J. Blondelle, A. Vandestienne, J. Piquereau, R. G. P. Denis, S. Guyot, H. Chauvin, A. Mourier, M. Maurer, C. Henry, N. Khadhraoui, C. Gallerne, T. Molinié, G. Courtin, L. Guillaud, M. Gressette, A. Solgadi, F. Dumont, J. Castel, J. Ternacle, J. Demarquet, A. Malgoire, N. Koulmann, G. Derumeaux, M.-F. Girard, F. Joubert, V. Veksler, S. Luquet, F. Relaix, L. Tiret, F. Pilot-Storck, Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle. *Sci. Adv.* **7**, eabd6322 (2021).

Supplementary Materials for

Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle

Alexandre Prola, Jordan Blondelle, Aymeline Vandestienne, Jérôme Piquereau, Raphaël G. P. Denis, Stéphane Guyot, Hadrien Chauvin, Arnaud Mourier, Marie Maurer, Céline Henry, Nahed Khadhraoui, Cindy Gallerne, Thibaut Molinié, Guillaume Courtin, Laurent Guillaud, Mélanie Gressette, Audrey Solgadi, Florent Dumont, Julien Castel, Julien Ternacle, Jean Demarquoy, Alexandra Malgoyre, Nathalie Koulmann, Geneviève Derumeaux, Marie-France Giraud, Frédéric Joubert, Vladimir Veksler, Serge Luquet, Frédéric Relaix*, Laurent Tiret*, Fanny Pilot-Storck*

*Corresponding author. Email: fanny.storck@vet-alfort.fr (F.P.-S.); laurent.tiret@vet-alfort.fr (L.T.); frederic.relaix@inserm.fr (F.R.)

Published 1 January 2021, *Sci. Adv.* 7, eabd6322 (2021)
DOI: 10.1126/sciadv.abd6322

The PDF file includes:

Tables S1 to S7
Supplementary Listing S1
Figs. S1 to S6

Other Supplementary Material for this manuscript includes the following:

(available at advances.sciencemag.org/cgi/content/full/7/1/eabd6322/DC1)

Table S3

Table S1: Anatomical parameters of WT and *Hacd1*-KO mice after normal or high fat diet.
Related to Figures 1 and S1.

	WT ND	<i>Hacd1</i> -KO ND	WT HFD	<i>Hacd1</i> -KO HFD
Eviscerated BW (g)	29.9 ± 1.4	26.3 ± 1.5	33.1 ± 2.1	25.8 ± 1.3 *
Initial BW (g)	29.3 ± 0.9	26.3 ± 0.5 **	29.6 ± 0.6	25.4 ± 0.7 ***
Final BW (g)	32.4 ± 1.2	28.8 ± 0.4 **	44.2 ± 1.3 \$\$\$	31.4 ± 1.4 ***
BW gain (g)	3.1 ± 0.6	2.5 ± 0.3	14.6 ± 1.0 \$\$\$	6.3 ± 1.0 ***\$
BW gain (%)	10.4 ± 1.8	9.7 ± 1.1	49.5 ± 3.2 \$\$\$	25.3 ± 3.9 ***\$\$
Tibial length (cm)	1.78 ± 0.03	1.80 ± 0.04	1.74 ± 0.02	1.74 ± 0.02
Heart weight (mg)	130.3 ± 4.9	120.1 ± 3.6	153.7 ± 7.6 \$	130.7 ± 13.5 **
Lung weight (mg)	185.8 ± 16.4	164.9 ± 11.6	273.3 ± 27.9	221.2 ± 9.9
Liver weight (mg)	1633.7 ± 85.1	1309.6 ± 39.0	1698.5 ± 118.2	1132.7 ± 103.1 \$
Kidney weight (mg)	214.9 ± 11.2	185.9 ± 7.2	203.8 ± 5.8	205.2 ± 3.9
<i>Tibial anterior</i> (mg)	46.1 ± 1.3	37.5 ± 0.9 **	47.9 ± 1.8	40.8 ± 1.3 ***
Gonadal fat pad (mg)	416 ± 82	279 ± 90	2182 ± 244 \$\$\$	1079 ± 244 **\$
Retroperitoneal fat pad (mg)	157.2 ± 47.3	94.3 ± 16.5	927.8 ± 83.0 \$\$\$	353.3 ± 91.2 ***
Mesenteric fat pad (mg)	567.2 ± 27.5	504.0 ± 42.9	942.7 ± 121.2 \$\$	452.0 ± 102.7 **
BAT weight (mg)	133.9 ± 16.9	79.3 ± 5.8 **	283.2 ± 26.2 \$\$\$	174.1 ± 26.9 \$\$\$**
HW/BW	4.21 ± 0.11	4.83 ± 0.14 *	3.52 ± 0.15 \$	3.96 ± 0.22 \$\$
Lung /BW	5.98 ± 0.44	6.61 ± 0.43	6.24 ± 0.49	6.66 ± 0.27
Liver/BW	52.63 ± 1.39	52.53 ± 0.82	38.57 ± 2.06 \$	33.45 ± 1.76 \$
Kidney/BW	6.92 ± 0.13	7.46 ± 0.26	4.70 ± 0.21 \$	6.24 ± 0.33
TA/BW	1.75 ± 0.03	1.52 ± 0.04 **	1.11 ± 0.02 \$\$\$	1.23 ± 0.00 \$\$\$
Gonadal fat pad/BW	11.85 ± 2.03	9.13 ± 0.72	53.31 ± 5.04 \$\$\$	34.26 ± 5.87 *\$
Retroperitoneal fat pad/BW	4.44 ± 1.23	3.01 ± 0.37	22.81 ± 1.34 \$\$\$	11.13 ± 2.31 ***\$\$\$
Mesenteric fat pad/BW	16.37 ± 0.59	16.27 ± 0.37	23.13 ± 1.94 \$	14.31 ± 2.35 *
BAT/BW	4.25 ± 0.40	3.18 ± 0.21 *	6.43 ± 0.50 \$\$	5.05 ± 0.57 \$\$*

Table S2: Echocardiographic parameters of WT and *Hacd1*-KO mice.
Related to Figures 2 and S2.

	WT	<i>Hacd1</i>-KO
EF(%)	81.2 ± 2.3	83 ± 2.2
FS (%)	44.8 ± 2.5	46.7 ± 2.7
HR (bpm)	631 ± 9	624 ± 17
LVd (mm)	2.73 ± 0.11	2.88 ± 0.05
LVs (mm)	1.51 ± 0.10	1.54 ± 0.10
IVSd (mm)	0.83 ± 0.04	0.78 ± 0.03
IVSs (mm)	1.43 ± 0.05	1.44 ± 0.05
PWd (mm)	0.82 ± 0.03	0.80 ± 0.04
PWs (mm)	1.36 ± 0.07	1.48 ± 0.05
Strain rate ant (unit/s)	25.64 ± 1.40	23.25 ± 1.33
Strain rate post (unit/s)	25.91 ± 1.60	23.75 ± 1.08

Table S3: Proteomic dataset and Panther analysis.
Related to Figure S2.

See Table S3 Excel File .

Table S4: Mitochondrial respiration rates.
Related to Figures 3 and S3.

Mitochondrial respiration rates for different complexes in WT or *Hacd1*-KO mice superficial *gastrocnemius* and *soleus* permeabilized muscle fibers.

	WT <i>Gast.</i> (6)	<i>Hacd1</i>-KO <i>Gast.</i> (6)	<i>P</i>
Vo	2.16 ± 0.29	4.10 ± 0.45	0.003
Complex I	11.06 ± 0.89	9.37 ± 1.03	0.235
Complex I+II	16.11 ± 1.56	12.26 ± 1.42	0.089
Complex II	5.71 ± 0.54	3.45 ± 0.44	0.006
Ratio CxII/CxI	0.52 ± 0.04	0.37 ± 0.05	0.020
ACR (Complex I/Vo)	5.73 ± 0.94	2.71 ± 0.68	0.007
	WT <i>Soleus</i> (6)	<i>Hacd1</i>-KO <i>Soleus</i> (6)	<i>P</i>
Vo	4.21 ± 0.49	7.92 ± 0.55	<0.001
Complex I	19.72 ± 2.31	16.05 ± 1.39	0.263
Complex I+II	25.07 ± 2.78	23.46 ± 2.28	0.652
Complex II	13.78 ± 2.93	15.37 ± 1.62	0.534
Ratio CxII/CxI	0.68 ± 0.03	0.67 ± 0.05	0.878
ACR (Complex I/Vo)	4.83 ± 0.35	3.05 ± 0.28	<0.001
	WT <i>Heart</i> (4)	<i>Hacd1</i>-KO <i>Heart</i> (4)	<i>P</i>
Vo	5.40 ± 0.30	5.62 ± 0.32	0.611
Complex I	27.25 ± 1.28	29.67 ± 1.83	0.299
Complex I+II	37.34 ± 2.76	44.59 ± 3.80	0.207
ACR (Complex I/Vo)	5.22 ± 0.42	5.39 ± 0.38	0.782

Mitochondrial substrate utilization in WT or *Hacd1*-KO mice superficial *gastrocnemius* and *soleus* permeabilized muscle fibers.

	WT <i>Gast.</i> (6)	<i>Hacd1</i>-KO <i>Gast.</i> (6)	<i>P</i>
Vo	0.97 ± 0.16	2.07 ± 0.14	<0.001
Palmitoyl-CoA	2.27 ± 0.30	3.06 ± 0.35	0.043
+ octanoate	2.29 ± 0.36	3.10 ± 0.30	0.026
+ pyruvate	7.37 ± 0.52	7.49 ± 0.36	0.851
+ Glutamate/Succinate	10.27 ± 0.98	11.18 ± 0.62	0.425
ACR (PCoA/Vo)	3.07 ± 0.61	1.52 ± 0.16	0.003
% fatty acids	27.33 ± 4.81	28.33 ± 2.47	0.845
% pyruvate	59.03 ± 5.06	67.90 ± 2.67	0.112
% PCoA/Octanoate	97.52 ± 6.21	97.71 ± 1.76	0.975
	WT <i>Soleus</i> (6)	<i>Hacd1</i>-KO <i>Soleus</i> (6)	<i>P</i>
Vo	3.32 ± 0.81	6.04 ± 0.50	<0.001
Palmitoyl-CoA	12.83 ± 1.13	15.79 ± 1.03	0.049
+ octanoate	14.65 ± 0.75	17.89 ± 0.89	0.011
+ pyruvate	18.88 ± 1.17	20.44 ± 1.82	0.583
+ Glutamate/Succinate	24.14 ± 1.54	25.14 ± 1.90	0.931
ACR (PCoA/Vo)	3.85 ± 0.22	2.77 ± 0.26	0.004
% fatty acids	61.96 ± 3.50	72.69 ± 2.76	0.025
% pyruvate	78.48 ± 2.14	81.01 ± 2.12	0.583
% PCoA/Octanoate	86.03 ± 4.72	89.22 ± 5.93	0.678

Mitochondrial respiration rates in isolated mitochondria from WT or *Hacd1*-KO mice TA.

	WT (4)	<i>Hacd1</i>-KO (4)	<i>P</i>
Phosphorylating (State 3)	101.55 ± 19.72	48.03 ± 7.20	0.044
State 4	10.90 ± 0.87	12.75 ± 2.01	0.432
RCR	9.14 ± 1.24	3.12 ± 0.48	0.004
Non-phosphorylating	14.34 ± 1.70	11.25 ± 1.04	0.172
Uncoupled	189.42 ± 16.95	160.78 ± 16.48	0.153
Cyt-C stimulation (%)	7.80 ± 3.80	8.57 ± 3.98	0.667
VO₂ (for ATP/O determination)	129.87 ± 6.80	96.62 ± 10.57	0.038
ATP production (for ATP/O determination)	2.02 ± 0.24	0.89 ± 0.22	0.011

Table S5: Non-linear mixed-effects models of the fluorescence decay of TMA-DPH.
 Related to Figure S6.

Non-linear mixed-effects models of the fluorescence decay from the analyses of mtIM.

	<i>Dependent variable:</i>			
	Experimental response (event count/ns)			
	A	B1	B2	C
θ_1	0.455*** (0.153)	0.505*** (0.153)		
B_1	0.025*** (0.001)		0.025*** (0.001)	
θ_2	-2.852*** (0.242)	-2.631*** (0.257)		
B_2	0.0002* (0.0001)		0.0001* (0.0001)	
θ_3	-0.697*** (0.087)	-0.667*** (0.094)		
B_3	0.016*** (0.001)		0.016*** (0.001)	
B_1 (inter.)		0.029*** (0.002)		0.029*** (0.002)
B_1 (WT)		-0.007*** (0.002)		-0.007*** (0.002)
B_2 (inter.)		0.001*** (0.0002)		0.0005*** (0.0002)
B_2 (WT)		-0.0004 (0.0003)		-0.0004 (0.0003)
B_3 (inter.)		0.018*** (0.001)		0.018*** (0.001)
B_3 (WT)		-0.002 (0.002)		-0.002 (0.002)
θ_1 (inter.)			0.752*** (0.160)	0.846*** (0.172)
θ_1 (WT)			-0.647*** (0.226)	-0.708*** (0.243)
θ_2 (inter.)			-2.629*** (0.316)	-2.432*** (0.336)
θ_2 (WT)			-0.509 (0.448)	-0.549 (0.476)
θ_3 (inter.)			-0.727*** (0.121)	-0.692*** (0.126)
θ_3 (WT)			0.040 (0.171)	0.028 (0.178)
Obs.	57,344	57,344	57,344	57,344
Log Likelihood	-136,223.600	-136,134.000	-136,268.900	-136,157.800
Akaike Inf. Crit.	272,475.300	272,301.900	272,571.900	272,355.600
Bayesian Inf. Crit.	272,600.700	272,454.200	272,724.100	272,534.800

Table S6: Sequence of qPCR primers used in this study.
Related to Materials and methods.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<i>Acadm</i>	CCGTTCCCTCTCATCAAAG	ACACCCATACGCCAACTCTT
<i>Acadvl</i>	TGGGCCTCTCTAATACCCAGT	TCCCAGGGTAACGCTAACAC
<i>Cd36</i>	CCACTGTGTACAGACAGTTTTGG	GCTCAAAGATGGCTCCATTG
<i>Catalase</i>	CCTCGTTCAGGATGTGGTTT	TCTGGTGATATCGTGGGTGA
<i>Coxl</i>	CACTAATAATCGGAGCCCCA	TTCATCCTGTTCTGCTCCT
<i>Cpt1</i>	TCACCTGGGCTACACGGAGA	TCGGGGCTGGTCTACACTT
<i>Cpt2</i>	ACCTGCTCGCTCAGGATAAA	AAACGACAGAGTCTCGAGCAG
<i>Fas</i>	GCAAGTGCAGCCTGAGGGAC	ACAGCCTGGGGTCATCTTTGC
<i>Gpx1</i>	GTTTCCCGTGCAATCAGTTC	TCACTTCGCACTTCTCAAACA
<i>Hadha</i>	GCTTGGGAGGAGGACTTGA	AGCAACACTTCAGGGACACC
<i>Nrf1</i>	TTACTCTGCTGTGGCTGATGG	CCTCTGATGCTTGCCTGCTCT
<i>Pex11a</i>	TCAAGAGGCTGGAGACCAGT	CGGTTGAGGTTGGCTAATGT
<i>Pex19</i>	TGTACCCATCCCTGAAGGAG	TGTGCTGCTGCTGGTACTTC
<i>Polr2a</i>	CAACATGCTGACAGATATGACC	TGATGATCTTCTTCTTGTGTCTG
<i>Ppara</i>	AAGTGCCTGTCTGTCTGGGAT	GCTTCGTGGATTCTCTTGCC
<i>Ppard</i>	GGGACCAGAACACACGCTT	CCGCACACCCGACATTCCAT
<i>Ppargc1a</i>	CACCAAACCCACAGAGAACAG	GCAGTTCCAGAGAGTTCCACA
<i>Ppargc1b</i>	TGGAAAGCCCTGTGAGAGT	TTGTATGGAGGTGTGGTGGG
<i>Rpl32</i>	GCTGCTGATGTGCAACAAA	GGGATTGGTACTCTGATGG
<i>Rplpo</i>	GCGACCTGGAAGTCCAATA	TTGTCTGCTCCCACAATGAA
<i>Sod2</i>	AGGAGCAAGGTCGCTTACAG	GTAGTAAGCGTGCTCCCACA
<i>Scd1</i>	CTACATGACCAGCGCTCTG	CGTACACGTCATTCTGGAACG
<i>Scd2</i>	GTAATCAGCGCCCTGGGCAT	CATACACGTCATTCTGGAACGC
<i>Srebp-1c</i>	CTGGAGACATCGCAAACAAGCTG	TGAGGTTCCAAAGCAGACTGCAG
<i>Tfam</i>	GCTGATGGGTATGGAGAAG	GAGCCGAATCATCCTTTGC
<i>Ucp1</i>	AGGGAGAGAAACACCTGCC	GCATTCTGACCTTCACGACC
<i>Ucp2</i>	CAGATGTGGTAAAGTCCGC	CAGAAGTGAAGTGGCAAGGG
<i>Ucp3</i>	ATGGTTGGACTTCAGCCCTC	TGGGGGTGTAGAACTGCTTG

Table S7: Key resources table.
Related to Materials and methods.

REAGENT or RESOURCE	SOURCE	IDENTIFIER
Antibodies		
Rabbit anti-AMPK	Cell signaling	2532
Rabbit anti-phospho-AMPK	Cell signaling	2535
Rabbit anti-Citrate Synthase	Cell signaling	14309
Rabbit anti-UCP3	Abcam	ab10985
Mouse anti-ATP5A	Abcam	ab110413
Rabbit anti-VDAC	Custom	N/A
Mouse anti-β-actin	Santa Cruz	47778
Chemicals, Peptides, and Recombinant Proteins		
Sodium pyruvate	Sigma	P2256
Palmitoyl coenzyme A lithium salt	Sigma	P9716
L-Carnitine inner salt	Sigma	C0158
L-Glutamic acid potassium salt monohydrate	Sigma	G1501
L-(-)-Malic acid	Sigma	M6413
Sodium succinate dibasic	Sigma	14160
Adenosine 5'-diphosphate monopotassium salt dihydrate	Sigma	A5285
Adenosine 5'-triphosphate disodium salt hydrate	Sigma	A3377
β-Nicotinamide adenine dinucleotide, reduced disodium salt hydrate	Sigma	N8129
Carbonyl cyanide 4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (FCCP)	Sigma	C2910
N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	Sigma	T3134
(+)-Sodium L-ascorbate	Sigma	A7631
Magnesium chloride solution	Sigma	63069
Sodium azide	Sigma	S2002
Cytochrome c from equine heart	Sigma	C2506
Oligomycin from Streptomyces diastatochromogenes	Sigma	O4876
Digitonin	Sigma	D141
Saponin	Sigma	84510
Acetyl coenzyme A lithium salt	Sigma	A2181
Oxaloacetic acid	Sigma	O4126
5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)	Sigma	D8130
Trizma® base	Sigma	T1503
Potassium hexacyanoferrate(III)	Sigma	P3667
Bovine Serum Albumin	Sigma	A7030
D-(+)-Glucose	Sigma	G7021
Sodium dithionite	Sigma	1.06507
Dibasic potassium phosphate	Sigma	1551128
Potassium phosphate monobasic	Sigma	P5655
Sodium bicarbonate	Sigma	S5761
TRI Reagent®	Sigma	T9424
Nitrotetrazolium Blue chloride	Sigma	N6876
Menadione	Sigma	M5625
rac-Glycerol 1-phosphate disodium salt hydrate	Sigma	G2138
Glycerol	Sigma	G7757
Calcium chloride dihydrate	Sigma	C3881
Hepes sodium salt	Sigma	H7006
MOPS	Sigma	M1254
Ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid	Sigma	03777
Hematoxylin Solution, Mayer's	Millipore	109249
Oil Red O	Sigma	O0625
Bolt™ 4-12% Bis-Tris Plus Gels, 17-well	Thermo Fisher Scientific	NW04127BOX
TMA-DPH (N,N,N-Trimethyl-4-(6-phenyl-1,3,5-hexatrien-1-yl)phenylammonium p-toluenesulfonate)	Sigma	T0775
cis-Aconitic acid	Sigma	A3412
Triton™ X-100	Sigma	T9284
Sodium pyrophosphate dibasic	Sigma	P8135
Acetoacetyl coenzyme A sodium salt hydrate	Sigma	A1625
Fluorescent mounting medium containing chromatin stain DAPI	Vectashield®	H-1200
Sodium cyanide	Sigma	431591
Rhodamine 123	Sigma	R8004

Perchloric acid	Sigma	311421
Cardiolipin from bovine heart	Sigma	C0563
TopFluor® Cardiolipin	Sigma	810286C
Egg PC	Sigma	131601C
Texas Red™ DHPE	Thermofischer	T1395MP
HEPES	Sigma-Aldrich	H3375-100G
Potassium Acetate	Sigma-Aldrich	P1190-500G
6-Aminocaproic acid	Sigma-Aldrich	A7824-25G
EDTA disodic	euromedex	EU0007-B
Glycerol	VWR	24388.295
Invitrogen™ Novex™ NativePAGE™ 3-12%% Bis-Tris Protein Gels, 1.0mm, 10 well	Fisher Scientific	10064012
Digitonin	Merck	300410-5GM
D-(+)-Sucrose, ultrapure DNase RNase free	VWR	0335-500g
Tris-Base	Euromedex	200923-A
EGTA	Sigma-Aldrich	E3889-100G
Potassium chloride	Alfa Aesar	11595-A1
Magnesium Chloride, HexaHydrate	Euromedex	2189-B
KH2PO4 Potassium phosphate, monobasic, anhydrous	Euromedex	2018-A
Iodonitrotetrazolium	Sigma-Aldrich	I8377-1G
Diaminobenzidine	Sigma-Aldrich	32750-5G-F
Cytochrome c from bovine heart	Sigma-Aldrich	C2037-500MG
Critical Commercial Assays		
ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II	Roche	11699695001
Pierce BCA	Thermo Fisher Scientific	23225
SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Fisher Scientific	34095
Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR	Thermo Fisher Scientific	K1641
Maxima SYBR Green qPCR Master Mix (2X), with separate ROX vial	Thermo Fisher Scientific	K0252
Rat/Mouse Insulin ELISA	Millipore	EZRMI-13K
Deposited Data		
Raw and analyzed data	This paper	github.com/hchauvin/prola2019
Uniprot Mus Musculus database	Uniprot	uniprot.org
GenBank sequence database	NIH	ncbi.nlm.nih.gov/genbank/
Experimental Models: Organisms/Strains		
Mouse: <i>Hacd1</i> -KO mice in the C57BL/6N genetic background	Home-made	ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26160855
Oligonucleotides		
Primers, see Table S6	This paper	N/A
Software and Algorithms		
ImageJ	NIH	fiji.sc
SigmaStat 3.0	Systat Software	systatsoftware.com
GraphPad	GraphPad Software	graphpad.com/company/
Algorithms for TMA-DPH decay analysis	This paper	github.com/ProlaLab/Prola2020.Sci.Adv
PANTHER Classification system	GENEONTOLOGY	http://pantherdb.org/
XTandem Pipeline	The Global Proteome Machine Organization	http://pappso.inra.fr/bioinfo/xtandempipeline

Supplemental Listing S1 | Final non-linear mixed effects models of the fluorescence decay of TMA-DPH on mitoplasts and whole mitochondria.
Related to Figure S6. *(in the R statistical language).*

```
1 library(nlme)
2
3 # Shared coefficients between Hacd1-KO and WT
4 model_A <- nlme(
5   Decay ~ ...,
6   fixed = theta1 + B1 + theta2 + B2 + theta3 + B3 ~ 1,
7   random = list(
8     File = pdDiag(B1 + B2 + B3 + theta1 + theta2 + theta3 ~ 1)
9   ),
10  weights = varConstPower(fixed = c(power = 0.5), const = 1, form = ~ fitted(.))
11 )
12
13 # Only Bs (resolving to mixing proportions) allowed to be different
14 # in Hacd1-KO and WT populations
15 model_B1 <- update(
16   model_A,
17   fixed = list(
18     theta1 + theta2 + theta3 ~ 1,
19     B1 + B2 + B3 ~ Population
20   )
21 )
22
23 # Only thetas (resolving to characteristic times) allowed to be different
24 model_B2 <- update(
25   model_A,
26   fixed = list(
27     theta1 + theta2 + theta3 ~ Population,
28     B1 + B2 + B3 ~ 1
29   )
30 )
31
32 # All coefficients allowed to be different
33 model_C <- update(
34   model_A,
35   fixed = theta1 + B1 + theta2 + B2 + theta3 + B3 ~ Population
36 )
```

Supplemental Table S1 | Anatomical parameters of WT and *Hacd1*-KO mice after normal or high-fat diet. Related to Figures 1 and S1.

Anatomical parameters measured after 9 wk of normal (ND) or high-fat diet (HFD). BW: body weight; initial and final: before and after the 9-wk period of ND or HFD, respectively; BW gain: difference between final and initial body weight; HW: heart weight; TA: *tibialis anterior* mass; GWAT, RWAT and MWAT: gonadal, retroperitoneal and mesenteric white adipose tissue weight, respectively; BAT: brown adipose tissue weight. Results are represented as mean \pm s.e.m.. $n = 9$. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ versus respective WT values. \$ $P < 0.05$; \$\$ $P < 0.01$; \$\$\$ $P < 0.001$ versus respective ND values.

Supplemental Table S2 | Echocardiographic parameters of WT and *Hacd1*-KO mice. Related to Figures 2 and S2.

Cardiac function of mice fed with normal diet was analyzed by echocardiography. EF: Ejection Fraction; FS: Fractional shortening; HR: Heart rate; LVd, LVs: Left Ventricle diameter in diastole and systole, respectively; IVSd, IVSs: interventricular septum thickness in diastole and systole, respectively; PWd, PWs: posterior wall thickness in diastole and systole, respectively. Strain rate was measured in unit/s (ant.) and (post.). Results are represented as mean \pm s.e.m.. $n = 8$ per group.

Supplemental Table S3 | Proteomic dataset and Panther analysis. Related to Figure S2.

Supplemental Table S4 | Mitochondrial respiration rates. Related to Figures 3 and S3.

Complex activity and substrate utilization unit is $\mu\text{molO}_2/\text{min/g}$ of dry mass of fibers or per g of protein for isolated mitochondria. Respiration rates in the presence of saturating pyruvate and ADP (Phosphorylating, State 3) and after complete ADP consumption (State 4). RCR: Respiratory Control Ratio. Respiration rates in the presence of oligomycin (Non-phosphorylating) and FCCP (Uncoupled). At the end of the experiment, cytochrome *c* was added to the medium (Cyt-C stimulation) to check that the stimulation of respiration did not exceed 10%, confirming the integrity of the outer mitochondrial membrane. Simultaneous measurement of respiration rates and ATP production in the presence of saturating pyruvate and ADP (State 3) for ATP/O determination. Values are given as mean \pm s.e.m.. Number in parentheses is the number of analyzed animals. Value for each animal was the mean of 1-3 independent analyses. For statistical analysis, unpaired t-test was used. ACR: Acceptor Control Ratio.

Supplemental Table S5 | Non-linear mixed-effects models of the fluorescence decay of TMA-DPH. Related to Figure S6.

Values are given as fixed effects \pm s.e for the variables defined in models A, B1, B2 and C (see *Materials and Methods*). More specifically, B_1 , B_2 and B_3 are scale coefficients for the three exponentials and θ_1 , θ_1 and θ_1 are monotonous parametrizations of characteristic times. For models B1, B2 and C, the variables are

regressed against the mice phenotype (WT or *Hacd1*-KO). The contrast matrix for this regression is given in the *Materials and Methods*. $P < 0.1$; $*P < 0.05$; $**P < 0.01$; $***P < 0.001$.

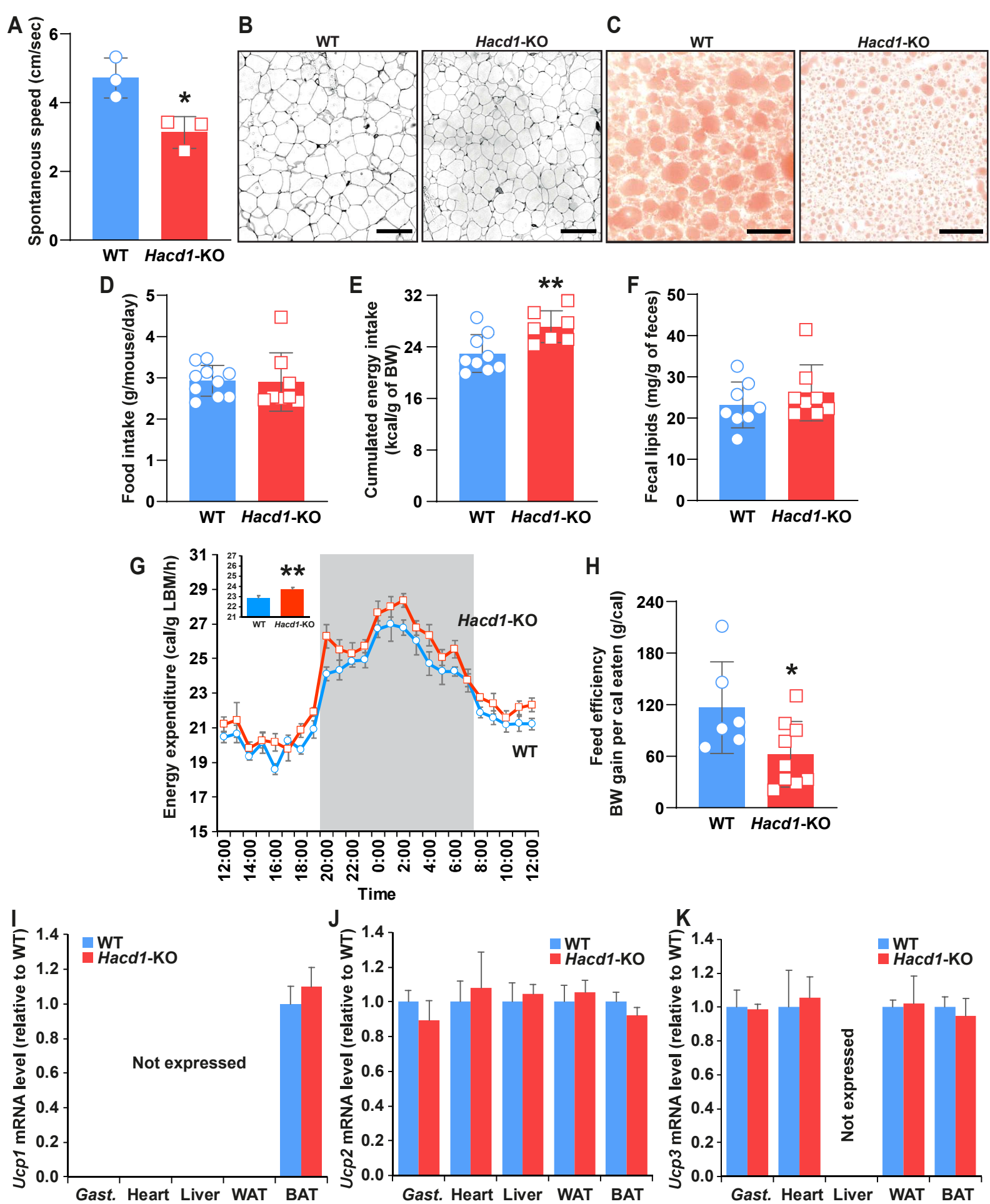
Supplemental Table S6 | Sequence of qPCR primers used in this study. Related to Materials and methods.

Supplemental Table S7 | Key resources table. Related to Materials and methods.

Supplemental Listing S1 | Final non-linear mixed effects models of the fluorescence decay of TMA-DPH on mitoplasts and whole mitochondria. Related to Figure S6.

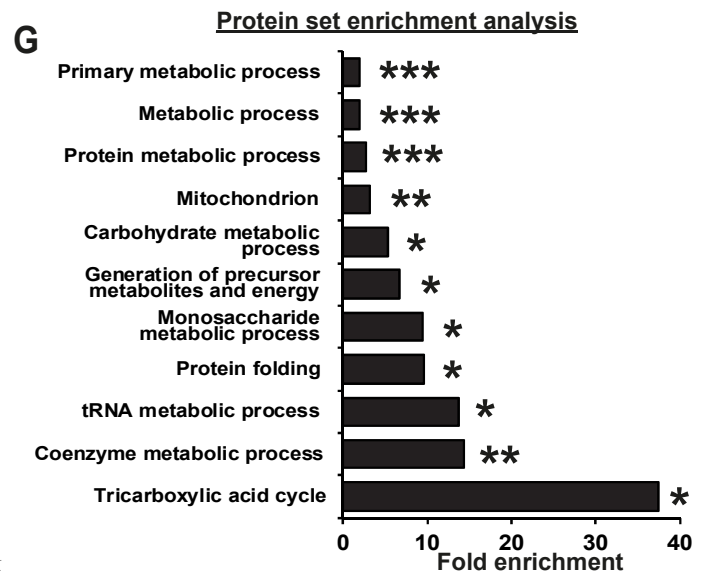
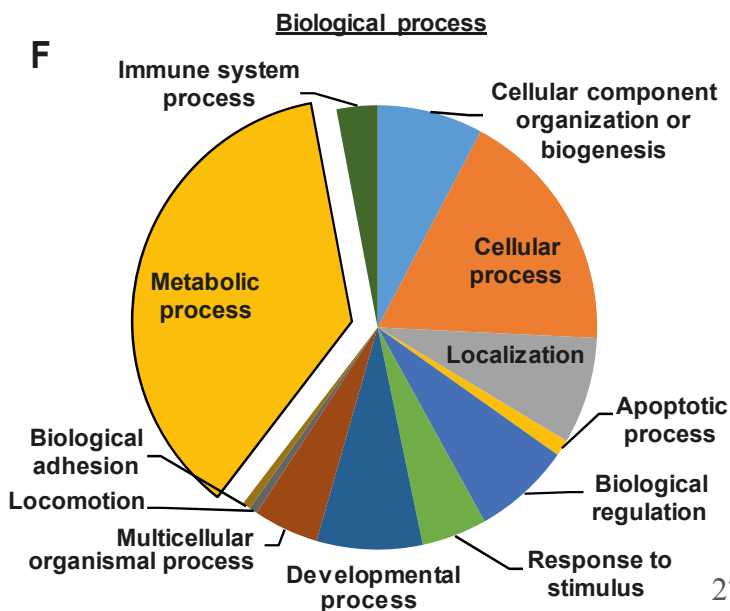
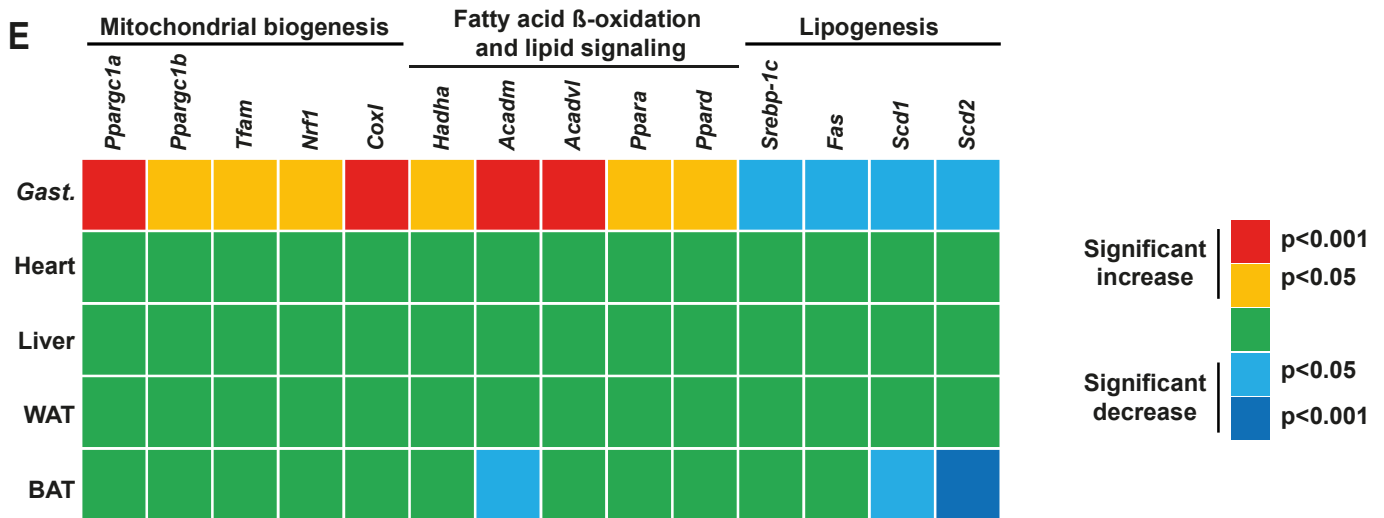
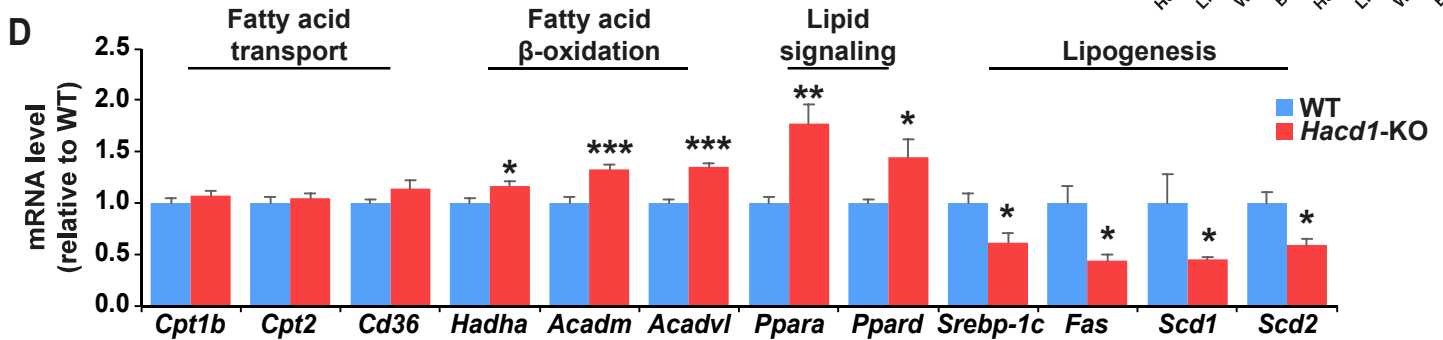
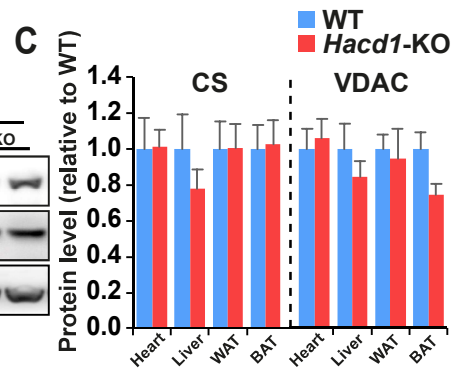
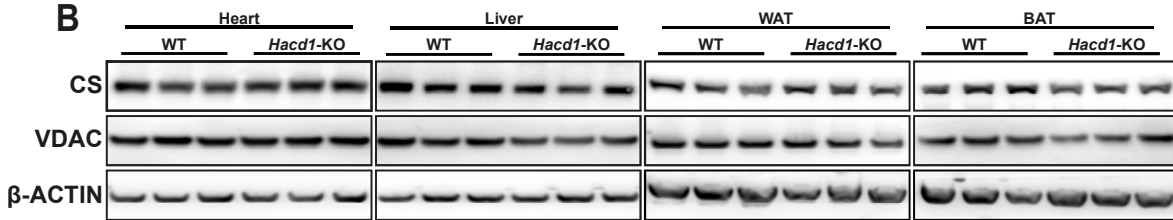
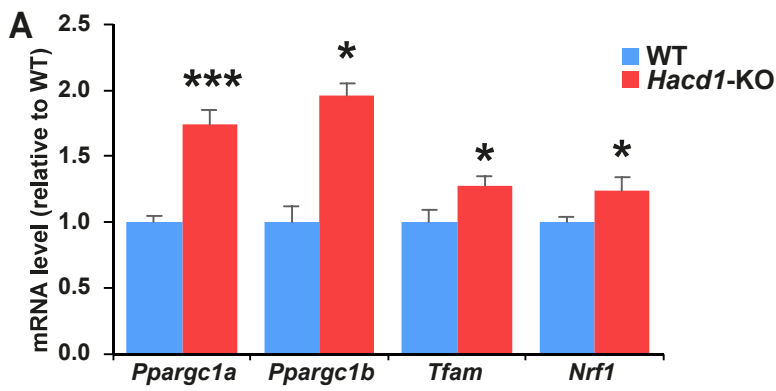
Specifics, given in the *R statistical language* for the **nlme** library, of the non-linear mixed effects models A, B1, B2 and C.

All the code is made available at github.com/ProlaLab/Prola2020.Sci.Adv with the appropriate tests and reproducible workflow (in addition, the releases are archived at DOI 10.5281/zenodo.1228112). The raw data is available upon request at DOI 10.5281/zenodo.4046133.



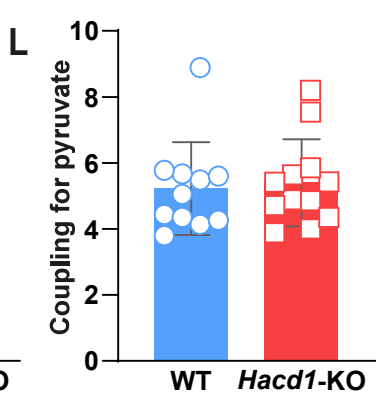
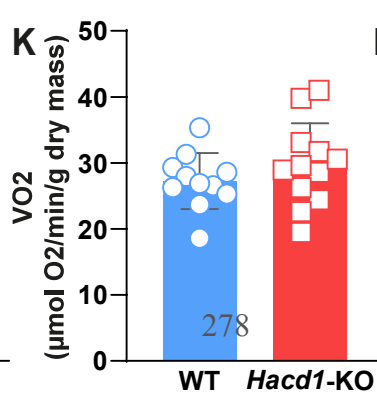
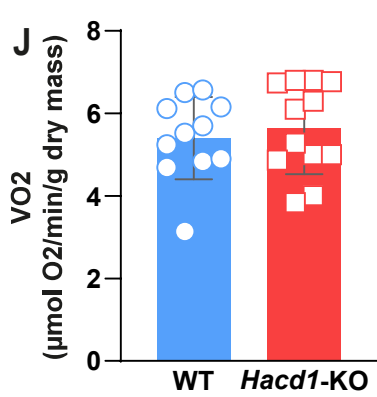
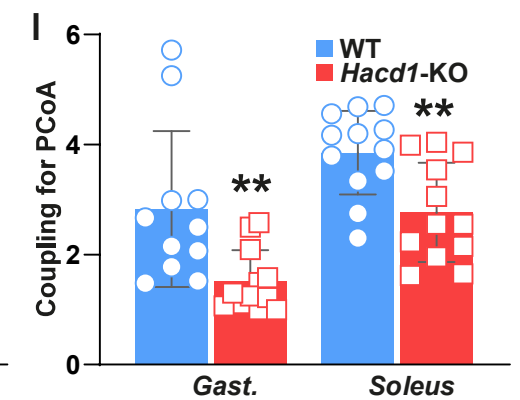
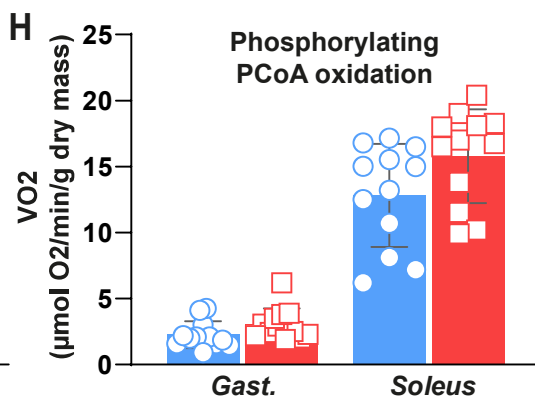
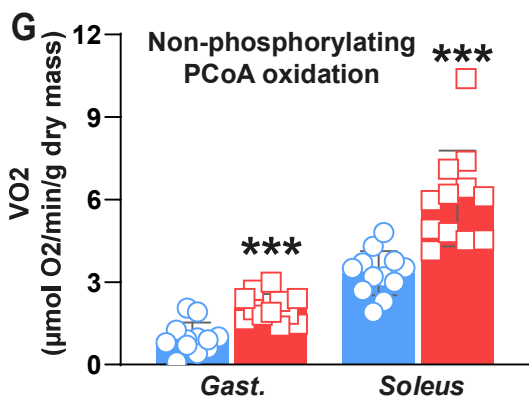
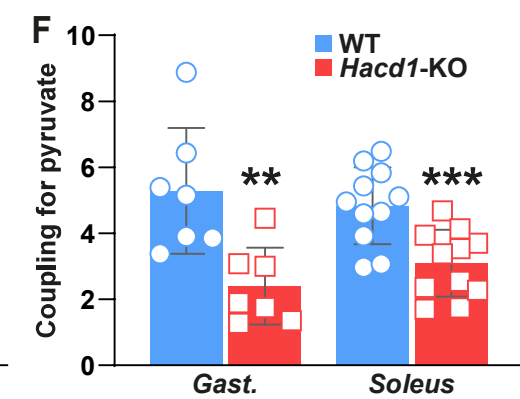
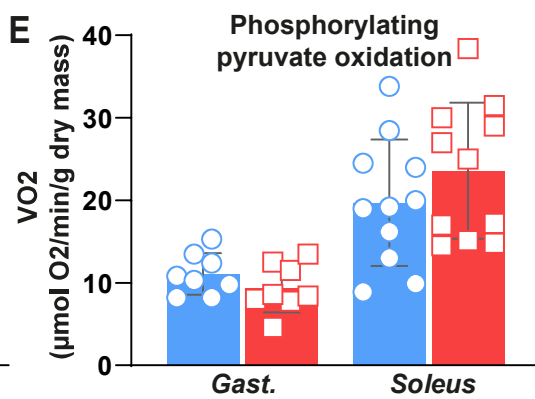
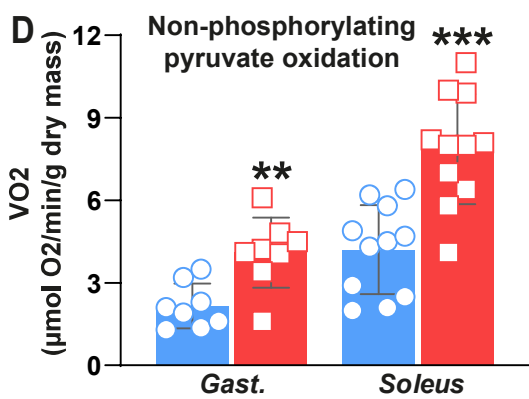
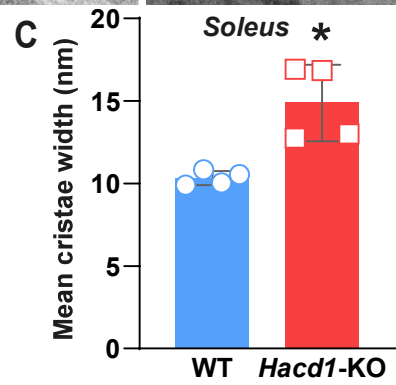
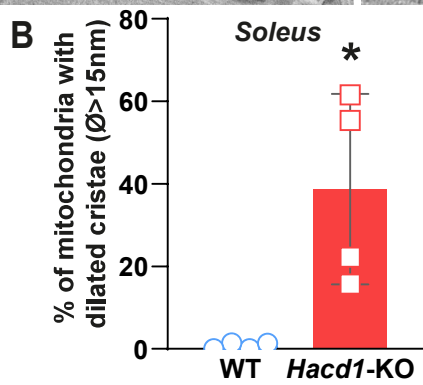
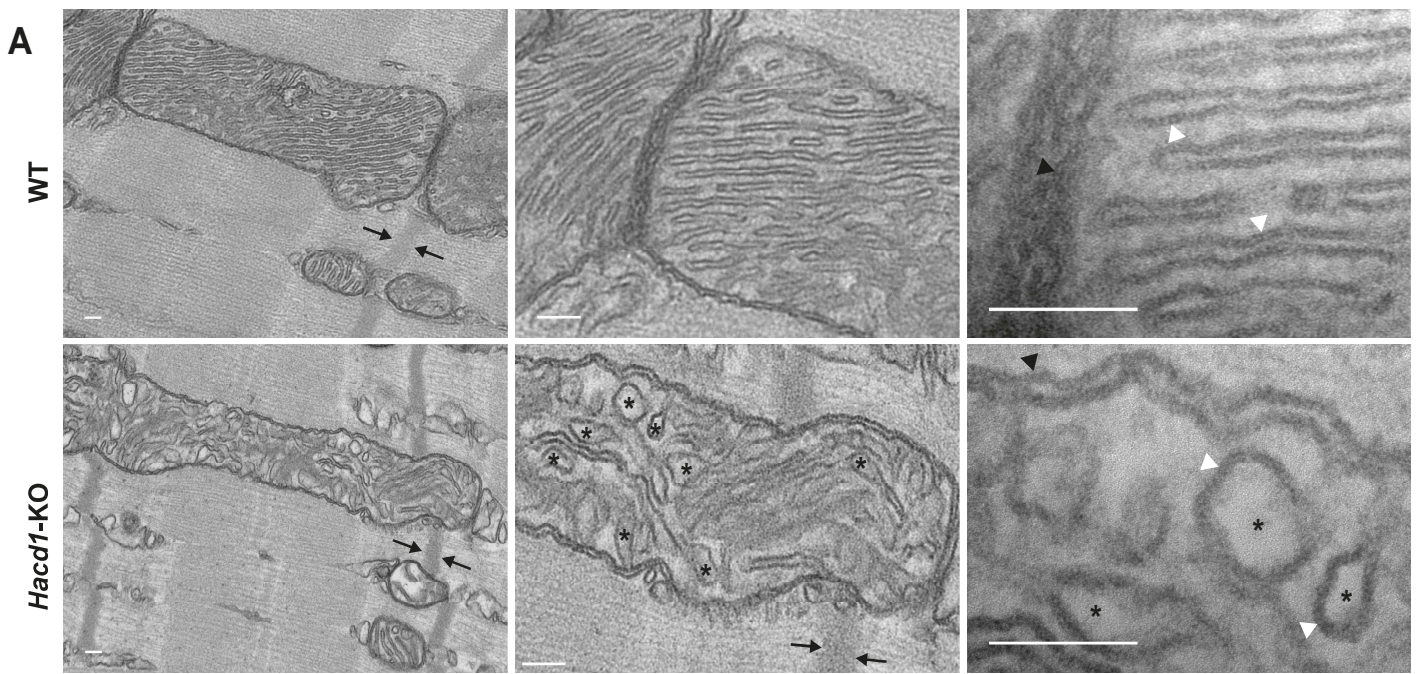
Supplemental Figure 1 | Metabolic parameters associated with protection against high-fat diet-induced obesity in *Hacd1*-KO mice. Related to Figure 1.

(A) Mean speed of spontaneous nocturnal locomotor activity. **(B)** Hematoxylin & Eosin-stained transverse sections of gonadal fat pads after 9 wk of high-fat diet (HFD), highlighting the contour of adipocytes. **(C)** Oil-Red-O-stained transverse sections of liver after 9 wk of HFD. **(D)** Mean daily food intake during the 9-wk period of HFD per mouse. **(E)** Cumulated energy intake during the 9-wk period of HFD. **(F)** Fecal lipid excretion after 8 wk of HFD. **(G)** Circadian energy expenditure measured by indirect calorimetry under normal diet (ND); the active period of night is shaded. Mean hourly energy expenditure during the assessment period is represented as histogram. **(H)** Feed efficiency during the 9-wk assessment period of ND. **(I-K)** *Ucp1* **(I)**, *Ucp2* **(J)** and *Ucp3* **(K)** mRNA expression normalized by geometrical mean of three independent reference genes in superficial *gastrocnemius* muscle (*Gast.*), heart, liver, gonadal white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT) of *Hacd1*-KO mice, compared to WT mice set to 1.0. Scale bars represent 50 μm in **B** and **C**. Error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus respective WT values.



Supplemental Figure 2 | Metabolic changes of *Hacd1*-KO mice are restricted to skeletal muscle. Related to Figure 2.

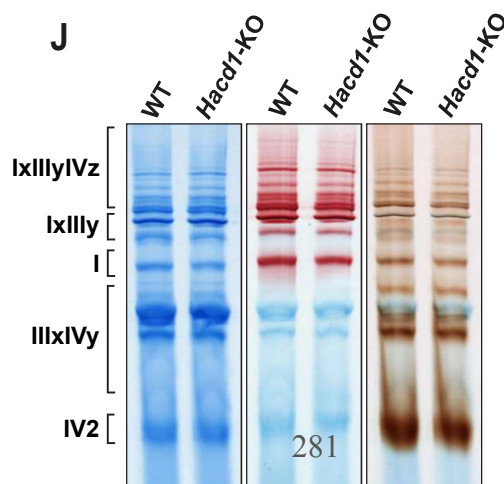
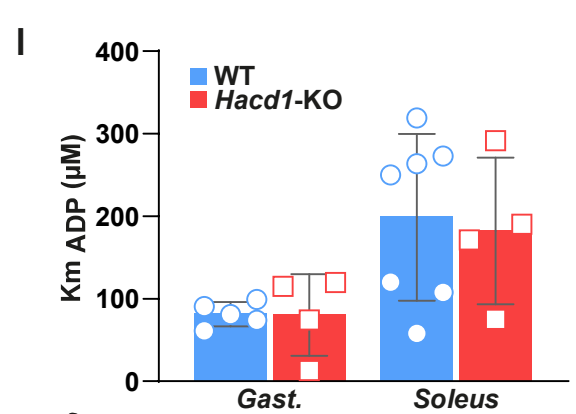
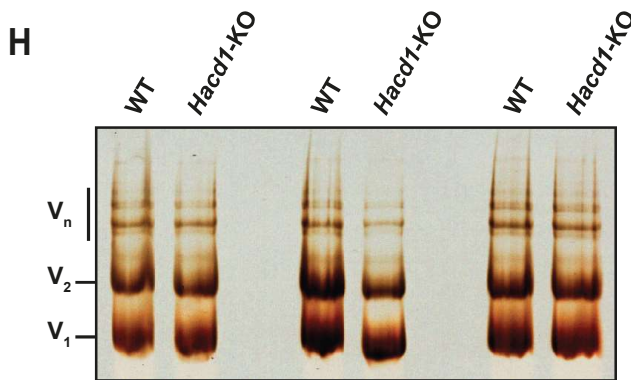
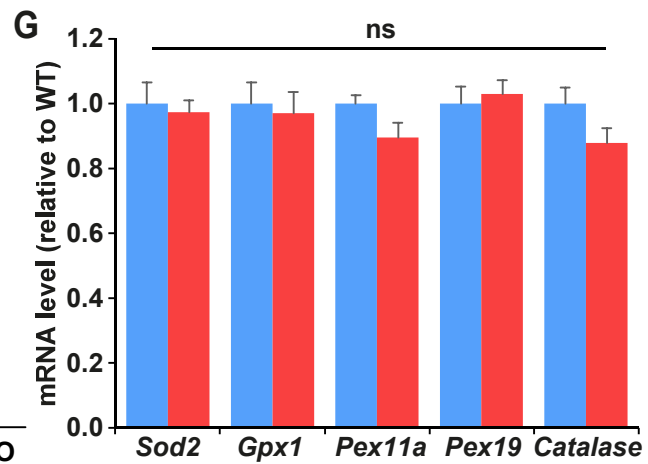
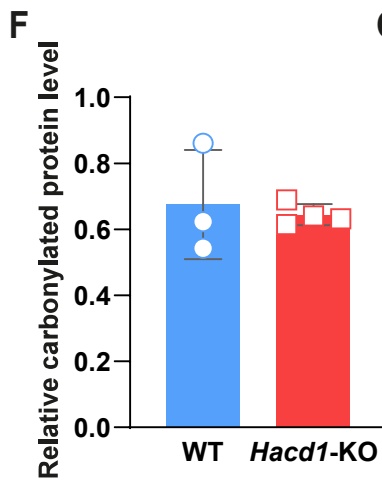
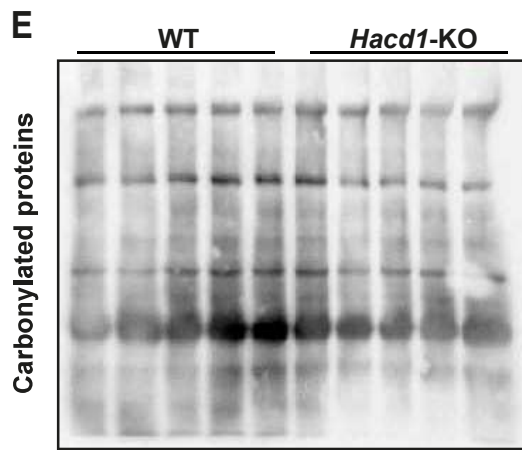
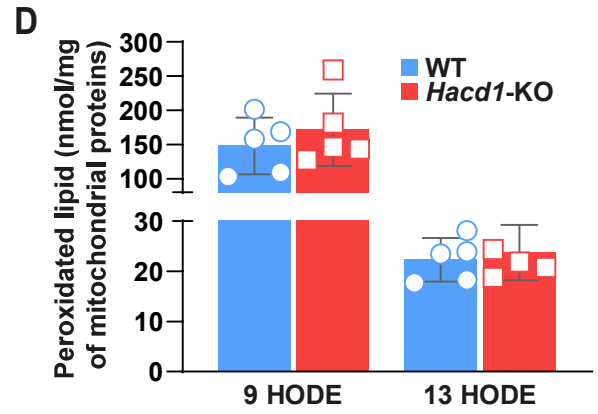
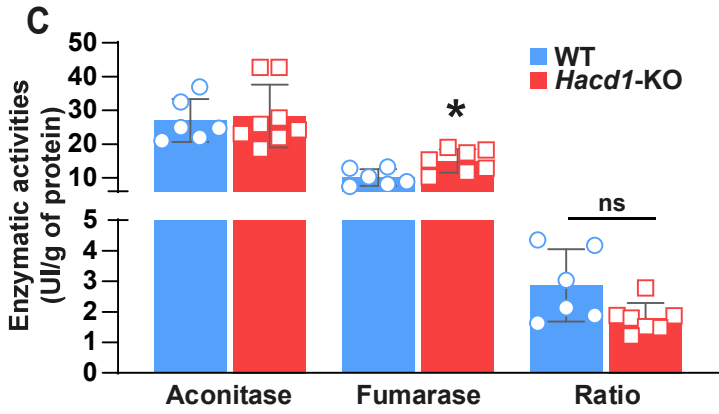
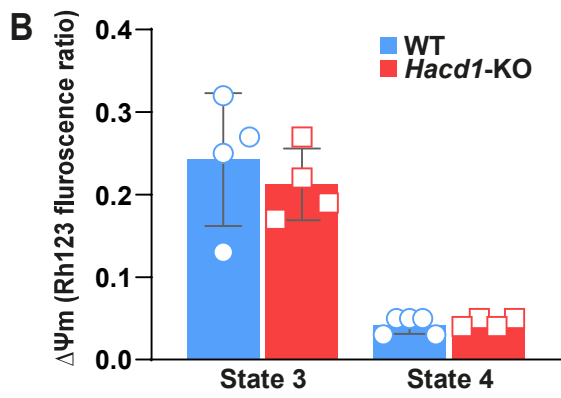
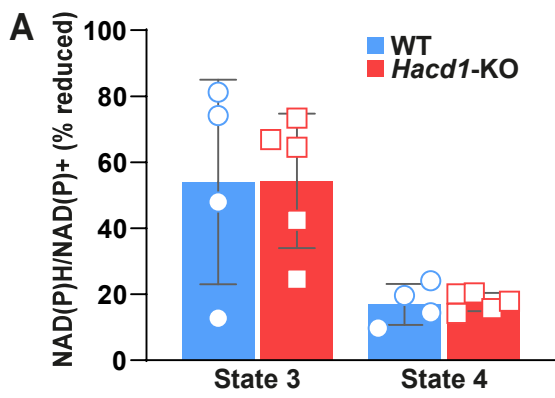
(A) *Ppargc1a*, *Ppargc1b*, *Tfam* and *Nrf1* mRNA expression normalized by the geometrical mean of three independent reference genes in superficial *gastrocnemius* muscle. **(B-C)** Representative immunoblots **(B)** and quantification **(C)** of CS and VDAC, normalized to the expression of β -Actin in heart, liver, white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT). **(D)** mRNA expression in superficial *gastrocnemius* muscle of a panel of genes involved in lipid metabolism, normalized by the geometrical mean of three independent reference genes. **(E)** mRNA expression of a panel of genes involved in mitochondrial biogenesis, lipid oxidation and lipogenesis, normalized by geometrical mean of three independent reference genes, in superficial *gastrocnemius* muscle (*Gast.*), heart, liver, gonadal white adipose tissue (WAT) and brown adipose tissue (BAT). **(F and G)** Gene ontology analysis and PANTHER protein set statistical enrichment analysis performed on the panel of the 96 proteins that are upregulated in the *tibialis anterior* muscle of *Hacd1*-KO mice, compared to WT mice. Error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus respective WT values.



Supplemental Figure 3 | Remodeled structure and modified respiratory parameters of skeletal muscle fibers of *Hacd1*-KO mice. Related to Figure 3.

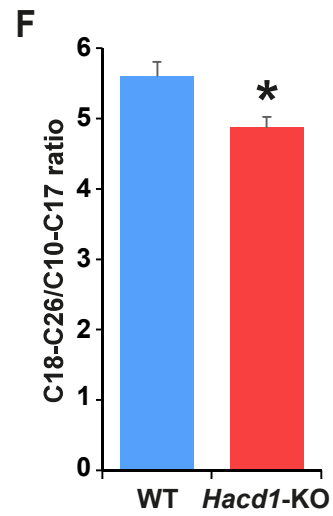
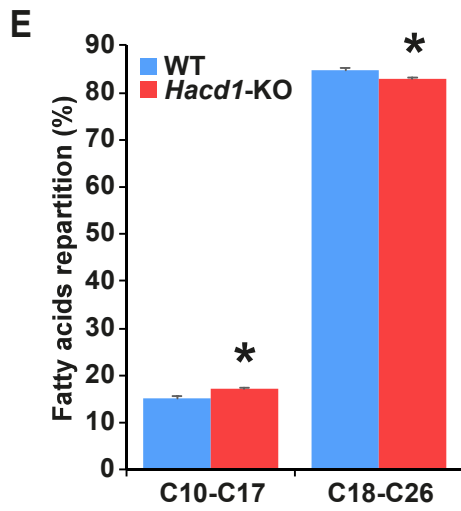
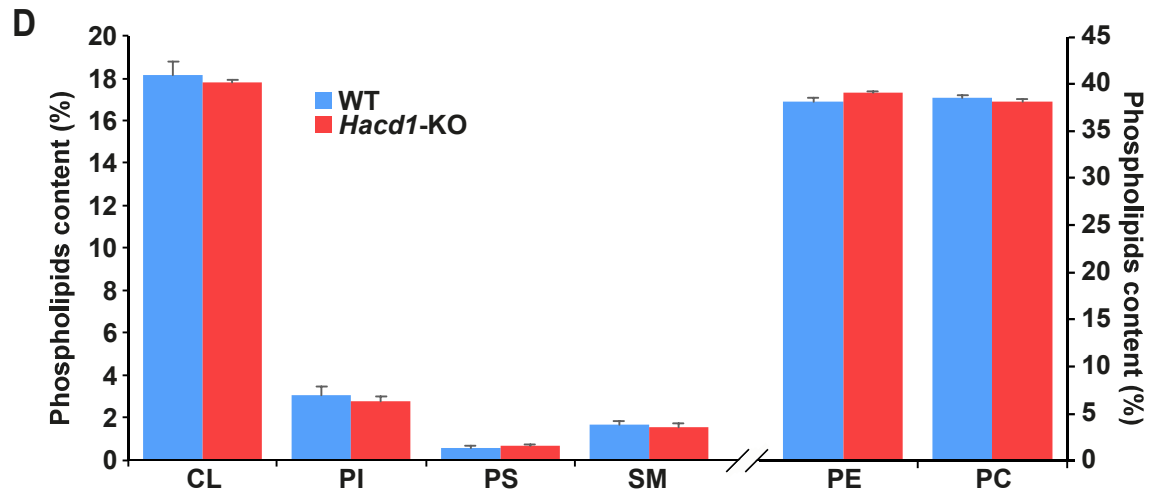
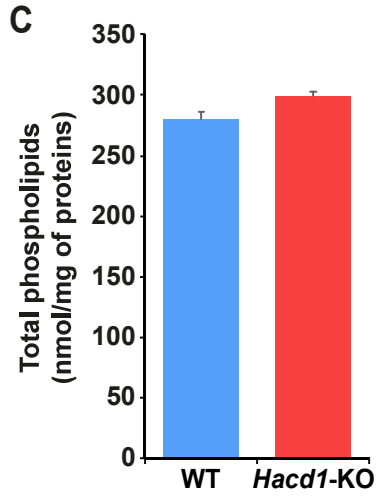
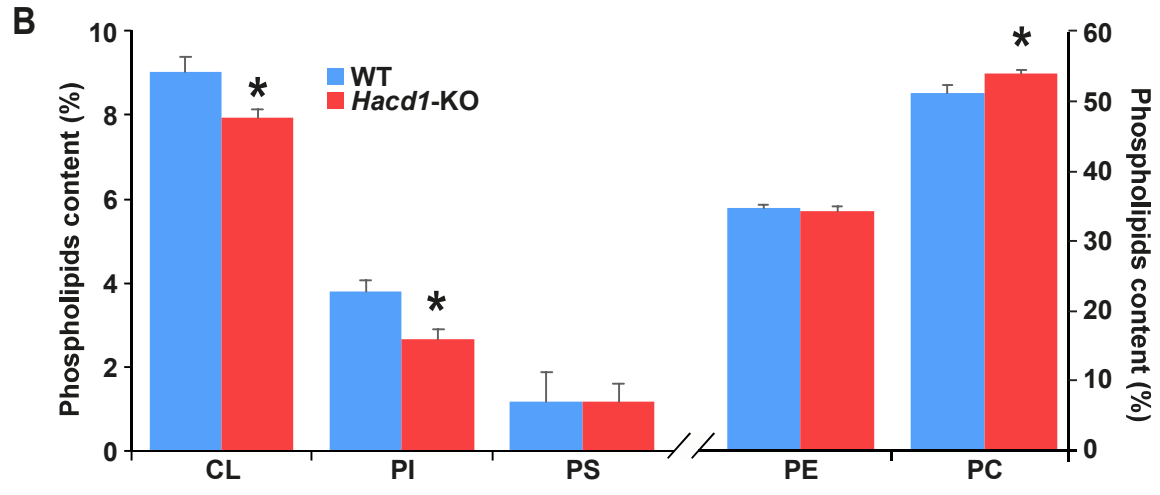
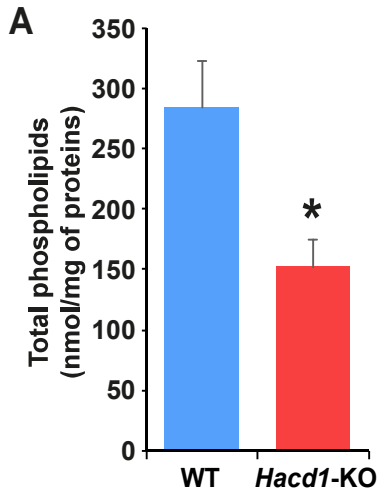
(A) Transmission electron microscopy of longitudinal sections of myofibers from *soleus* muscle. Images are from datasets taken at a low (x 2,500; left panel), intermediate (x 10,000; middle panel) and high (x 30,000; right panel) magnification. The Z-line is delimited by arrows. Cristae are regular tubular-shaped invaginations (white arrow heads) of the inner mitochondrial membrane, unambiguously identified on the same plane than the outer mitochondrial membrane (black arrow heads). Excessive dilation of cristae tips (asterisk) is frequently observed in *Hacd1*-KO myofibers. **(B and C)** Morphometric quantification in *soleus* muscle of the percentage of mitochondria containing cristae with excessively dilated tips (maximal diameter >15 nm) **(B)** and the mean maximal diameter of the tubular segment of cristae **(C)**. **(D and E)** Non-phosphorylating **(D)** and phosphorylating **(E)** oxidation rate in the presence of pyruvate in permeabilized myofibers freshly isolated from superficial *gastrocnemius* (*Gast.*) and *soleus* muscles. **(F)** Mitochondrial coupling for pyruvate (Acceptor Control Ratio (ACR) of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates of pyruvate from **D** and **E**). **(G and H)** Non-phosphorylating **(G)** and phosphorylating **(H)** oxidation rate in the presence of Palmitoyl-Coenzyme A (PCoA) in permeabilized myofibers freshly isolated from superficial *gastrocnemius* (*Gast.*) and *soleus* muscles. **(I)** Mitochondrial coupling for PCoA (ACR of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates of PCoA from **G** and **H**). **(J and K)** Non-phosphorylating **(J)** and phosphorylating **(K)** respiration rates of saponin-permeabilized cardiac fibers in the presence of pyruvate. **(L)** Mitochondrial coupling of saponin-permeabilized cardiac fibers in the presence of pyruvate (ACR of phosphorylating to non-phosphorylating oxidation rates of pyruvate

from **J** and **K**). Scale bars in **A**: 100 nm. Error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$ versus respective WT values.



Supplemental Figure 4 | Reduced mitochondrial coupling in muscle of *Hacd1*-KO mice is not associated with respiratory chain or ATP synthase dysfunction, nor oxidative stress. Related to Figure 3.

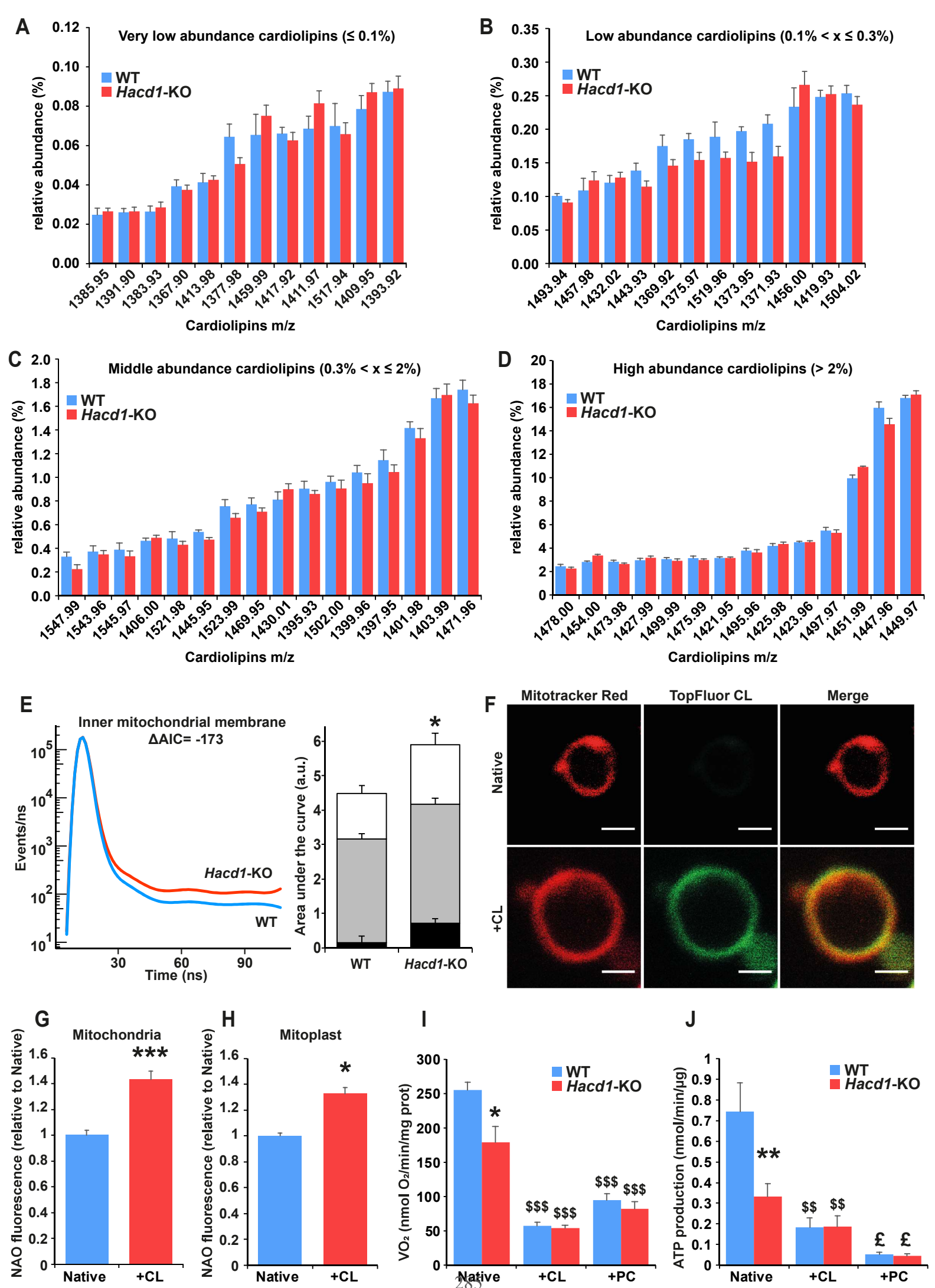
(A) NAD(P)H/NAD(P)⁺ ratio measured on isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle of WT and *Hacd1*-KO mice in state 4 (no ADP) and state 3 (2 mM ADP). **(B)** $\Delta\psi_m$ measured on isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle of WT and *Hacd1*-KO mice in state 4 (no ADP) and state 3 (2 mM ADP). **(C)** Aconitase and fumarase enzymatic activities and ratio of aconitase to fumarase activity in isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle. **(D)** 9-hydroxyoctadecadienoic acid (9-HODE) and 13-hydroxyoctadecadienoic acid (13-HODE) quantification in isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle. **(E and F)** Quantitative blotting of protein carbonylation in superficial *gastrocnemius* muscle. **(G)** *Sod2*, *Gpx1*, *Pex11a*, *Pex19* and *Catalase* mRNA expression normalized by geometrical mean of three independent reference genes in superficial *gastrocnemius* muscle. **(H)** In-gel activity of mitochondrial ATP synthase complexes isolated from the *tibialis anterior* muscle. **(I)** Apparent K_m of oxygen consumption for ADP on permeabilized fibers from superficial *gastrocnemius* (*Gast.*) and *soleus* muscles. **(J)** Analysis of the supramolecular organization of mitochondrial respiratory chain complexes in WT and *Hacd1*-KO mice. Mitochondria from the *tibialis anterior* muscle were analyzed by BN-PAGE, followed by Coomassie Brilliant Blue staining or In-gel enzyme activities (IGA) for complexes I or IV. The positions of respiratory chain complexes and supercomplexes are indicated to the left. (Representative image from three independent experiments.) Error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$ versus respective WT values.



Supplemental Figure 5 | Phospholipid and fatty acid quantification in mitochondria from *Hacd1*-KO mice. Related to Figure 4.

(A) Total phospholipid content of mitochondria isolated from the *tibialis anterior* muscle, normalized to the mitochondrial protein content. **(B)** Relative phospholipid species content of mitochondria isolated from the *tibialis anterior* muscle, normalized to the total content of mitochondrial phospholipids. **(C)** Total phospholipid content of mitochondria isolated from the heart, normalized to the mitochondrial protein content. **(D)** Relative phospholipid species content of mitochondria isolated from the heart, normalized to the total content of mitochondrial phospholipids. **(E and F)** Fatty acids repartition **(E)** and ratio of C18-26 to C10-17 **(F)** from total lipids of mitochondria isolated from the *tibialis anterior* muscle. CL = cardiolipins, PC = phosphatidylcholine, PE = phosphatidylethanolamine, PI = phosphatidylinositol, PS = phosphatidylserine, SM = sphingomyeline.

error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus respective WT values.



Supplemental Figure 6 | Cardiolipin enrichment in mitochondria from *Hacd1*-KO mice. Related to Figure 4.

(A-D) Relative cardiolipins composition of mitochondria isolated from tibialis anterior muscle of *Hacd1*-KO mice, compared to WT mice. Each cardiolipin species is expressed as a percentage of total cardiolipin content and separated as very low (<0.1%, **A**), low ($0.1\% < x \leq 0.3\%$, **B**), middle ($0.3\% < x \leq 2\%$, **C**) and high (>2%, **D**) abundance. **(E)** TMA-DPH lifetime decay (curves) and mixing proportions (histograms) in the inner mitochondrial membrane, measured on mitoplasts from the *tibialis anterior* muscle. **(F)** Representative images of mitoplasts made from native mitochondria or after fusion of mitochondria with TopFluor-Cardiolipin (CL) vesicles and stained with Mitotracker Red. Scale bar: 1 μ m. **(G and H)** Quantification of cardiolipin enrichment with Nonyl-Acridine Orange (NAO) staining on native mitochondria and after fusion with CL vesicles (**G**) and on mitoplasts isolated from the corresponding mitochondria (**H**). **(I and J)** Oxidation rate (**I**) and ATP production (**J**) measured on native isolated mitochondria from *tibialis anterior* muscle or after fusion with cardiolipin (+CL) or phosphatidylcholine (+PC) vesicles. n = 5 per group for **A-D**; error bars: \pm s.e.m.; multiple pair wise tests using Holm-Bonferroni method revealed no significant differences. Δ AIC = difference in the Akaike's Information Criterion (full analysis in Tables S5); error bars, \pm s.e.; * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ versus respective WT values; \$\$ = $P \leq 0.01$ vs Native, \$\$\$ = $P \leq 0.001$ vs Native, £ = $P \leq 0.05$ vs +CL.

RESULTATS 1 : REPONSE AUX REVIEWERS SUR LE PAPIER CARDIOLIPIN CONTENT CONTROLS MITOCHONDRIAL COUPLING AND ENERGETIC EFFICIENCY IN MUSCLE

Problématique

Dans le cadre de notre étude, nous avons montré des défauts du fonctionnement mitochondrial spécifiquement dans les muscles squelettiques des souris *Hacd1*-KO, et notamment une réduction du couplage respiratoire. Nous avons lié cet effet à une diminution de la quantité de cardiolipine, phospholipide essentiel de la membrane interne mitochondriale permettant entre autres la structuration des crêtes et probablement le transfert efficace des protons de la chaîne respiratoire vers l'ATP synthase.

Lors des révisions avant publication, il nous a été demandé si les défauts en phospholipides mitochondriaux observés étaient liés à un défaut de structuration des zones de contacts entre organites et mitochondries, les MAMs (*mitochondrial associated membranes*). En effet, les propriétés membranaires sont essentielles au fonctionnement des organites. Dans le cas de la mitochondrie, outre la fusion, les propriétés de la membrane externe sont nécessaires à l'établissement de ces contacts, vitaux pour qu'elle ait un fonctionnement optimal. Parmi ces contacts, on compte notamment sur ceux avec le RE, qui participent au transfert des phospholipides mitochondriaux. Un défaut dans l'établissement des MAMs aurait ainsi pu expliquer la réduction du contenu en phospholipides mitochondriaux chez les souris *Hacd1*-KO.

Résultats

Pour étudier le nombre de contacts entre RE et mitochondries, nous avons combiné deux approches : une approche en immunofluorescence et une méthode en microscopie électronique. Pour cette première approche, nous avons utilisé une méthode appelée *Proximity Ligation Assay* (PLA), marquant deux protéines à une distance d'environ 40 nm par un point fluorescent. Ainsi, des sections transversales de TA ont été immunomarquées avec un anticorps contre la protéine de la membrane mitochondriale externe VDAC et un anticorps contre une protéine de la membrane du RE, IP3R. Chacun de ces anticorps est produit dans une espèce différente, permettant au système *linker* de la technologie PLA de se lier à chacun des deux si la distance entre ces deux protéines le permet. Ainsi, si les protéines sont à une distance suffisamment proche, le *linker* pourra reconnaître les deux anticorps et ainsi changer de conformation, provoquant une fluorescence. Un point fluorescent est donc le reflet d'une proximité entre les deux protéines d'intérêt. Après avoir réalisé la PLA sur des sections de TA d'individus WT et *Hacd1*-KO, les images (**fig. 1-a**) ont été quantifiées pour obtenir une densité de points par mm². Celle-ci n'a montré aucune différence entre les individus WT et

Hacd1-KO. Cependant, cette technique ne permettant pas de voir des interactions très proches ou supérieures à 40 nm, nous avons voulu coupler cette observation avec une quantification sur images de microscopie électronique réalisées dans le muscle soléaire, muscle riche en mitochondries (**fig. 1-b**). En utilisant un logiciel conçu par nos collaborateurs M. Novotová (Université de Prague), *Stereology EM*, nous avons superposé une grille d'arcs de cercle sur les images de microscopie électronique. Ainsi, chaque arc de cercle était attribué à aucun, un ou plusieurs contacts entre mitochondrie et un autre organe ; ainsi, nous avons pu évaluer le nombre de contacts qu'établissent les mitochondries. Nous pouvons alors représenter le nombre de contacts entre RE et mitochondrie par image (**fig. 1-b**). Ceci nous a permis de constater qu'il n'y avait pas de différence significative de contact entre RE et mitochondrie chez les individus *Hacd1*-KO.

Conclusion - discussion

Nous avons ainsi montré ici par deux techniques complémentaires qu'il n'y avait pas de différence dans le nombre de contacts entre RE et mitochondrie dans notre modèle *Hacd1*-KO qui puisse expliquer la diminution des phospholipides mitochondriaux. Si la PLA est une méthode rapide et dont l'analyse est automatisable, elle présente l'inconvénient d'être très sélective dans la distance de *linker* ; en effet, deux protéines en contact ne seront pas forcément visualisées car leur forte proximité peut provoquer un repliement trop intense du *linker* qui ne pourra s'hybrider correctement. L'apport de la microscopie électronique, bien que plus complexe à analyser, a permis de pallier ce point. Nous avons donc de solides preuves que les MAMs ne semblent pas affectées dans notre modèle.

Ma contribution

J'ai mené l'ensemble des expérimentations nécessaires à la réalisation de cette partie de résultats.

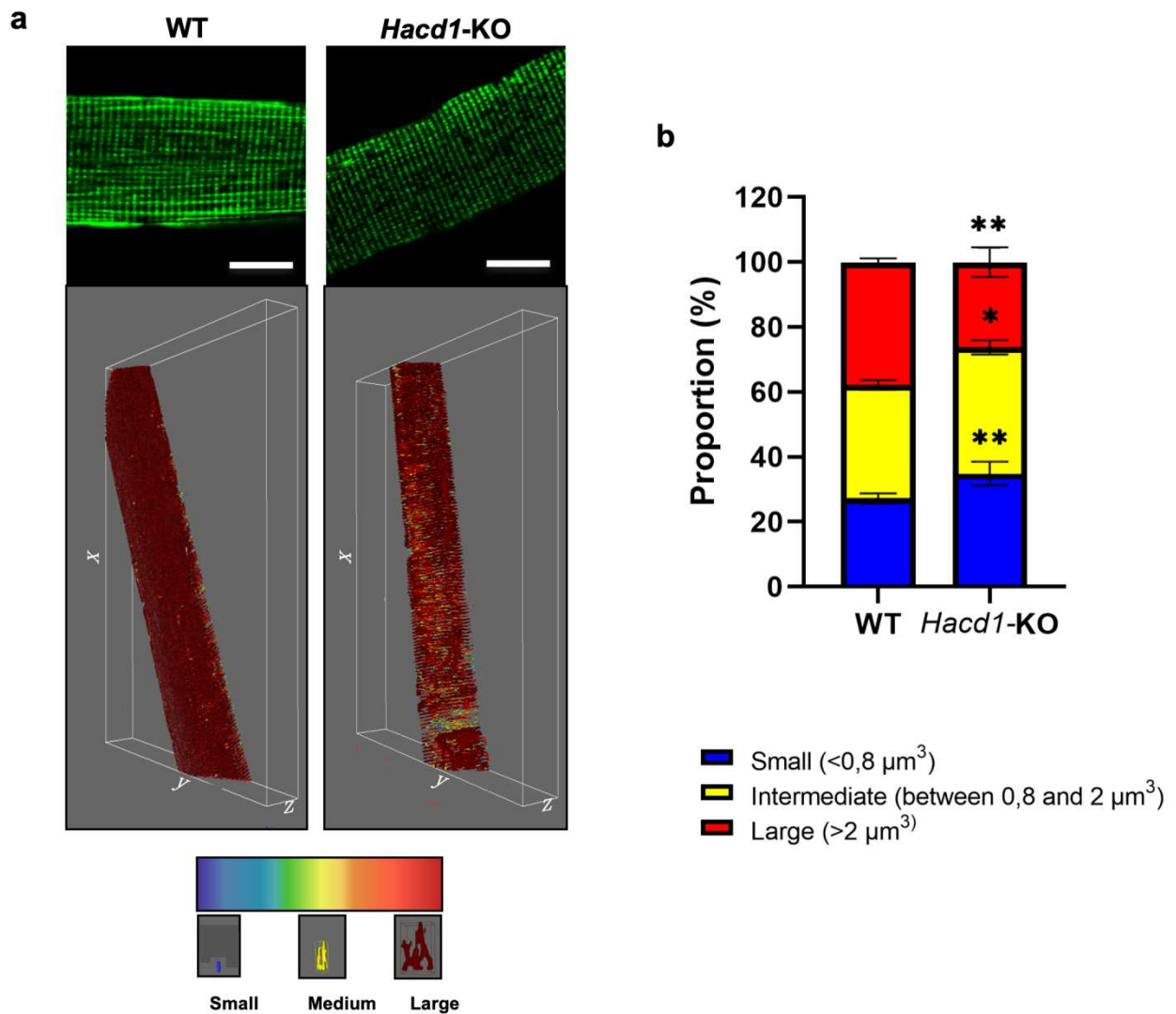


Figure 2 : Morphologie du réseau mitochondrial dans des myofibres.

(a) Scan d'un plan focal d'une fibre isolée à partir de l'EDL d'une souris WT et *Hacd1*-KO après incubation avec un marqueur mitochondrial fluorescent, le Mitotracker vert. La reconstruction tridimensionnelle est réalisée en fausse couleur, permettant de visualiser la taille des objets. (b) Répartition des objets fluorescents en fonction de leur taille dans des fibres d'individus WT et *Hacd1*-KO.

(*n*=3 individus, avec 3 fibres scannées par individu)

RESULTATS 2 : MORPHOLOGIE DU RESEAU MITOCHONDRIAL EN L'ABSENCE D'*HACD1*

Problématique

Nous avons démontré dans l'étude précédente que les souris *Hacd1*-KO présentent une forte réduction du couplage mitochondrial, provoquant une protection contre l'obésité, mais aussi une faible production d'ATP. Les hypothèses d'une surexpression de protéines découplantes de la famille des UCP ainsi qu'un fort taux d'apoptose ayant été écartées, ce défaut de couplage a été attribué au défaut de formation des crêtes. Cependant, il peut aussi être lié à une altération de la structure tridimensionnelle des mitochondries, c'est-à-dire de leur réseau. Nous avons donc voulu vérifier si ce dernier est modifié morphologiquement dans des fibres musculaires de souris *Hacd1*-KO.

Résultats

Afin de nous intéresser à la morphologie du réseau mitochondrial dans les fibres musculaires de souris *Hacd1*-KO, nous avons prélevé ces dernières chez des souris mâles adultes. Après dissociation, les fibres ont été colorées avec du MitoTracker vert, dont la dose a préalablement été optimisée pour les fibres musculaires isolées. Ces fibres, après un scan transverse et une reconstruction tridimensionnelle, ont permis de visualiser le réseau mitochondrial de souris WT et *Hacd1*-KO (**fig. 2-a**), que nous pouvons représenter en 3D avec un code couleur en fonction du volume mitochondrial. La quantification de ce volume a permis de mettre en évidence qu'il existe une fragmentation chez les individus *Hacd1*-KO (**fig. 2-b**), c'est-à-dire une augmentation du nombre de petites mitochondries au détriment des moyennes et grandes mitochondries par rapport au WT.

Une fragmentation du réseau peut s'expliquer par un défaut de potentiel mitochondrial (Legros et al., 2002), mais il n'y en a pas chez les souris *Hacd1*-KO (**voir publication 1**). Nous nous sommes donc penchés sur l'hypothèse d'un défaut de dynamique mitochondriale, potentiellement dû à un défaut de certaines protéines impliquées dans la fusion ou la fission. Une quantification des ARNm codant les principales protéines de fusion (*Mfn1*, *Mfn2* et *Opa1*) ou de fission (*Fis1*) dans des extraits de TA n'ont montré aucune altération de leur quantité chez les individus malades (**fig. 3-a**). De même, un western blot sur extrait protéique de TA a permis de remarquer qu'aucune protéine majeure n'était diminuée ou augmentée chez les individus *Hacd1*-KO, y compris pour les formes modifiées de manière post-traductionnelle (**fig. 3-b**). Ainsi, la fragmentation observée dans les individus *Hacd1*-KO ne semblent pas venir d'un défaut protéique.

Enfin, une telle fragmentation peut aussi être le résultat d'un défaut de dégradation de mitochondries altérées par mitophagie ; en effet, après fission, si celles-ci ne sont pas dégradées, elles pourraient s'accumuler et donc augmenter la fragmentation globale du réseau.

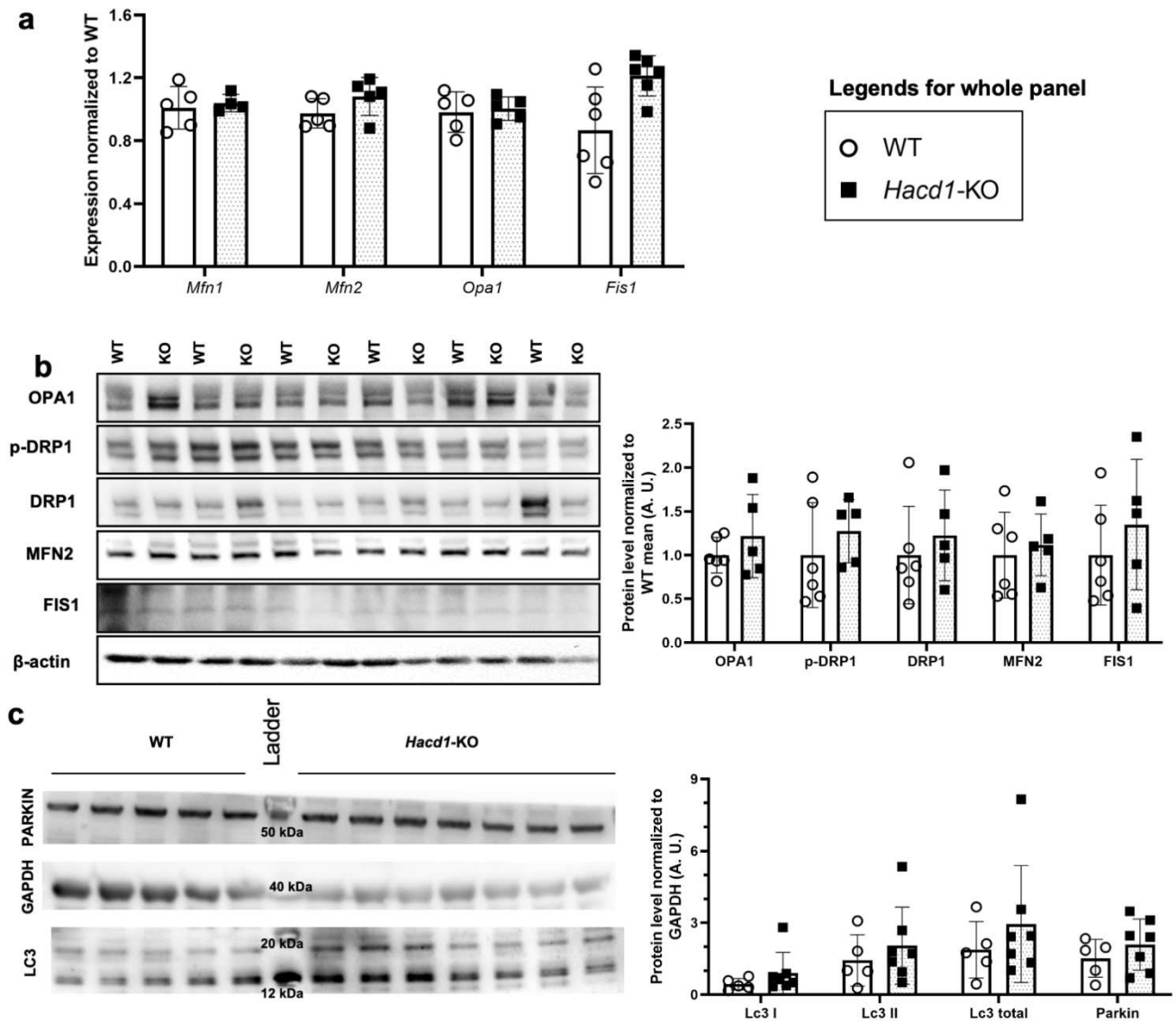


Figure 3 : Etude de la dynamique mitochondriale et de l'autophagie.

(a) Quantification par RT-qPCR de l'expression des gènes majeurs de régulation de la fusion (*Mfn1*, *Mfn2*, *Opa1*) et de la fission (*Fis1*) mitochondriale. L'expression pour chaque individu est rapportée à la moyenne des WT, fixée à 1. (b) Western blot quantifié des principales protéines intervenant dans la dynamique mitochondriale. La moyenne des WT est fixée à 1. (c) Western blot quantifié de LC3 et PARKIN, deux protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome. GAPDH est la protéine de normalisation.

Nous avons donc vérifié ceci par western blot sur des extraits de TA d'individus WT et *Hacd1*-KO (**fig. 3-c**). Nous avons observé les protéines LC3 (qui est recrutée à la membrane des autophagosomes après conjugaison à la phosphatidyléthanolamine (PE)) et PARKIN (qui se lie aux protéines de l'OMM et participe à la dégradation des mitochondries altérées) (**fig. 3-c**). Nous avons pu observer que l'autophagie ne semblait pas modifiée chez les souris *Hacd1*-KO, bien qu'ayant une tendance à être légèrement augmentée.

Nous avons alors posé l'hypothèse que la fragmentation pourrait venir d'un défaut de fusion des mitochondries, comme cela est le cas à une échelle supérieure, pour les myoblastes lors du développement des souris *Hacd1*-KO (Blondelle et al., 2015). Pour vérifier cela, nous avons d'abord évalué la rigidité des membranes mitochondriales, pour voir si nous observons une rigidification comme cela est le cas pour la membrane plasmique des myoblastes. Nous avons d'abord optimisé une technique de séparation des membranes, afin de pouvoir évaluer les caractéristiques de chacune d'entre elles, en faisant varier la quantité de digitonine ainsi que la température d'incubation des mitochondries (**fig. 4-a**). Suite à cela, nous avons réalisé l'étude de la rigidité des membranes mitochondriales en collaboration avec S. Guyot (Université de Bourgogne). Ceci a été fait grâce à une sonde fluorescente s'incorporant dans les bicouches lipidiques, appelée TMA-DPH (1-(4-Triméthylammoniumphényl)-6-Phényl-1,3,5-Hexatriène p-Toluènesulfonate). Dès lors, une lumière polarisée est envoyée sur l'échantillon. Si la membrane est fluide, la sonde subit de nombreuses fluctuations et renvoie des signaux dans diverses directions ; au contraire, si la membrane est rigide, la sonde bouge peu et ne modifie pas la polarisation de la lumière transmise (Karnovsky et al., 1982). Elle permet ainsi de déterminer indirectement une fluidité de membrane. Le TMA-DPH ne pouvant traverser la membrane, le marquage de la mitochondrie entière permet d'étudier la rigidité de la membrane externe, alors que son incorporation sur mitoplaste permet d'évaluer celle de la membrane interne. A 37°C, température physiologique corporelle, nous remarquons que la rigidité de la membrane interne n'est pas modifiée (**fig. 4-b**), alors que la membrane externe des mitochondries de souris *Hacd1*-KO est augmentée par rapport à celle des WT (**fig. 4-c**). Un contrôle à 5°C, qui induit l'immobilité des bicouches, a permis de valider les résultats obtenus à 37°C (**fig. 4-d-e**). Ceci suggère que la fragmentation mitochondriale des individus *Hacd1*-KO pourrait être liée à un défaut de rigidité membranaire, par défaut de fusion des mitochondries.

Pour vérifier que la fragmentation est due à un défaut de fusion et pas à une surfission, nous avons traité des myoblastes prélevés chez des souris WT et *Hacd1*-KO avec un inhibiteur de la fission, mdivi1. Cette molécule est un inhibiteur des dynamines, telles DRP1 ou DNM2, toutes deux impliquées dans la fission mitochondriale (Kraus and Ryan, 2017; Pernas and Scorrano, 2016). Ainsi, si le phénotype des individus *Hacd1*-KO est dû à une surfission mitochondriale, le traitement avec cette molécule devrait rétablir une morphologie mitochondriale normale plus efficacement que s'il est dû à un défaut de fusion. Nous avons réalisé ce traitement sur des myoblastes primaires non différenciés - qui expriment encore peu *Hacd1* - et sur des myoblastes différenciés, exprimant *Hacd1* (Blondelle et al., 2015). Les mitochondries des myoblastes primaires présentent une morphologie similaire entre les

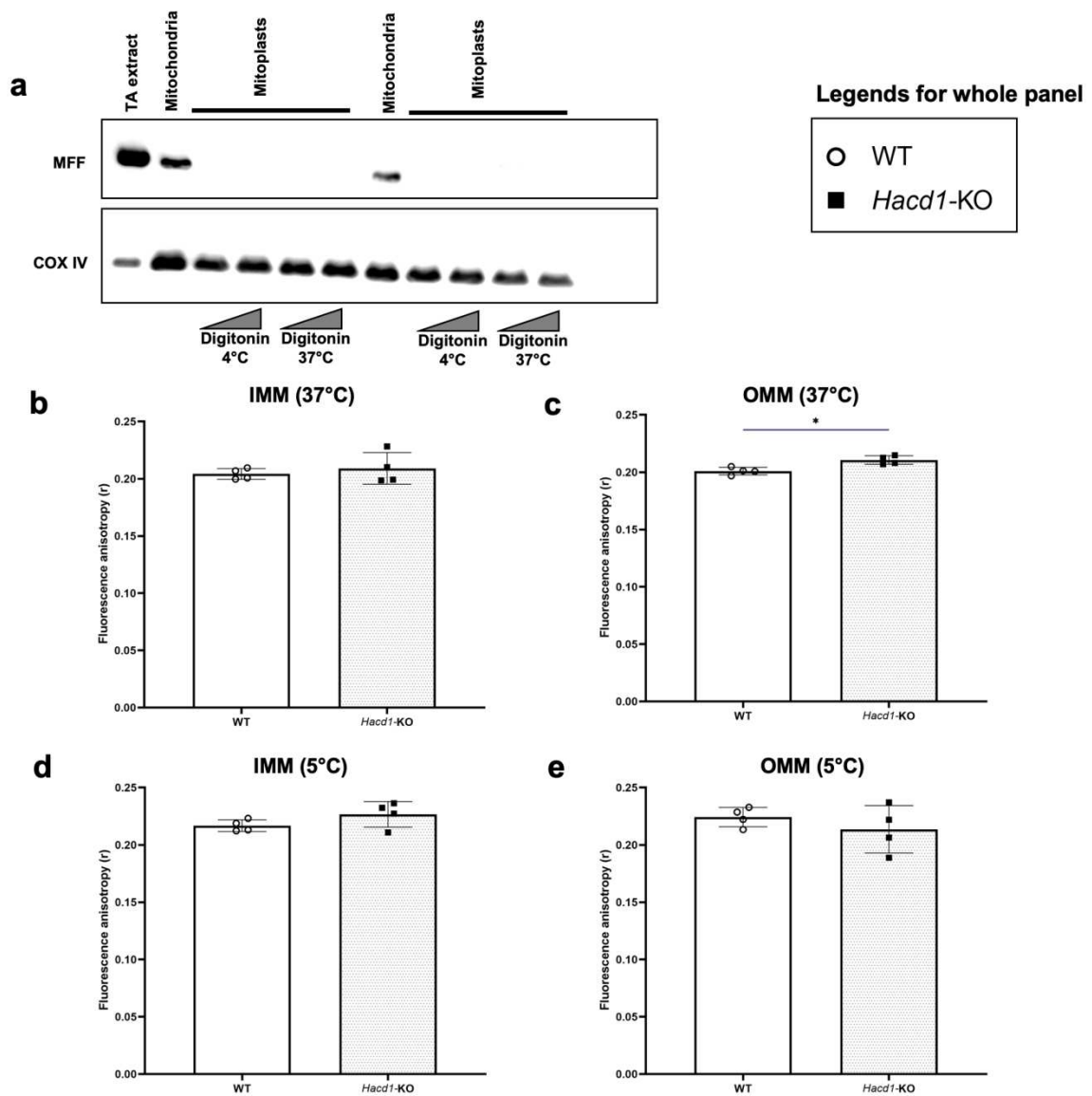


Figure 4 : Evaluation des caractéristiques physiques des membranes mitochondriales.

(a) Western blot sur des extraits de mitochondries entières, de membranes externes (*outer mitochondrial membrane*, OMM) et de membranes internes (*inner mitochondrial membrane*, IMM) pour vérifier la pureté des fractions avec différentes doses de digitonine et températures d'incubation. (b-e) Rigidité membranaire à 37°C et 5°C de la membrane mitochondriale interne (respectivement b et d) et externe (respectivement c et e) évaluée par anisotropie de fluorescence.

TA = *Tibialis anterior* ; MFF = *Mitochondrial Fission Factor*, protéine de l'OMM, COX IV = *Cytochrome c oxidase IV*, protéine de l'IMM.

a

	WT	<i>Hacd1</i> -KO	WT + mdivi1	<i>Hacd1</i> -KO + mdivi
Petits ($<0.3 \mu\text{m}^2$)	$39,84 \pm 12,77$	$41,04 \pm 9,90$	$35,51 \pm 11,85$	$41,16 \pm 10,89$ § ($p=0,0497$)
Moyens (de 0.3 à $1 \mu\text{m}^2$)	$41,87 \pm 9,10$	$39,36 \pm 8,62$	$43,23 \pm 8,16$	$39,93 \pm 8,20$ ($p=0,1452$)
Grands (plus de $1 \mu\text{m}^2$)	$18,29 \pm 6,47$	$19,60 \pm 4,19$	$21,26 \pm 5,64$ ($p=0,0542$)	$18,91 \pm 5,41$ ($p=0,1144$)

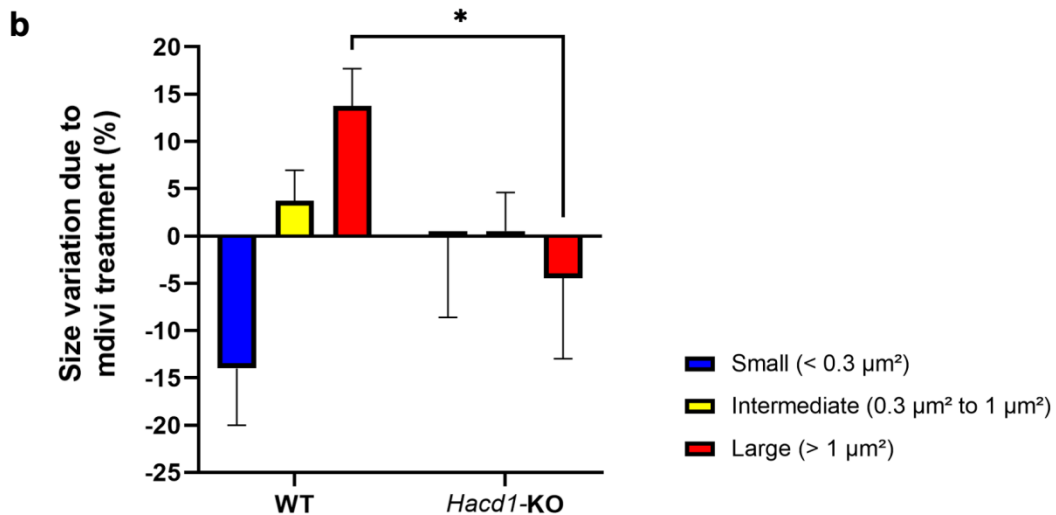


Figure 5 : Morphologie du réseau mitochondrial dans des myoblastes primaires.

(a) Tableau des proportions de mitochondries dans des myoblastes primaires de souris WT et *Hacd1*-KO en fonction de la taille, avec ou sans traitement par le mdivi1. (b) Pourcentage de variation par groupe de taille suite au traitement par le mdivi1.

* en comparaison aux contrôles non traités, § aux contrôles traités

a

	WT	<i>Hacd1</i> -KO	WT + mdivi1	<i>Hacd1</i> -KO + mdivi
Petits ($< 0.04 \mu\text{m}^3$)	36,17 \pm 6,95	31,36 \pm 8,17	31,57 \pm 5,87	29,48 \pm 6,64
Moyens (de 0.04 à $1 \mu\text{m}^3$)	58,26 \pm 6,02	61,86 \pm 7,17	61,30 \pm 4,77	61,99 \pm 5,41
Grands (plus de $1 \mu\text{m}^3$)	5,58 \pm 1,31	6,78 \pm 1,56	7,14 \pm 1,32* (p=0,02)	8,53 \pm 2,01 (<u>p=0,08</u>)

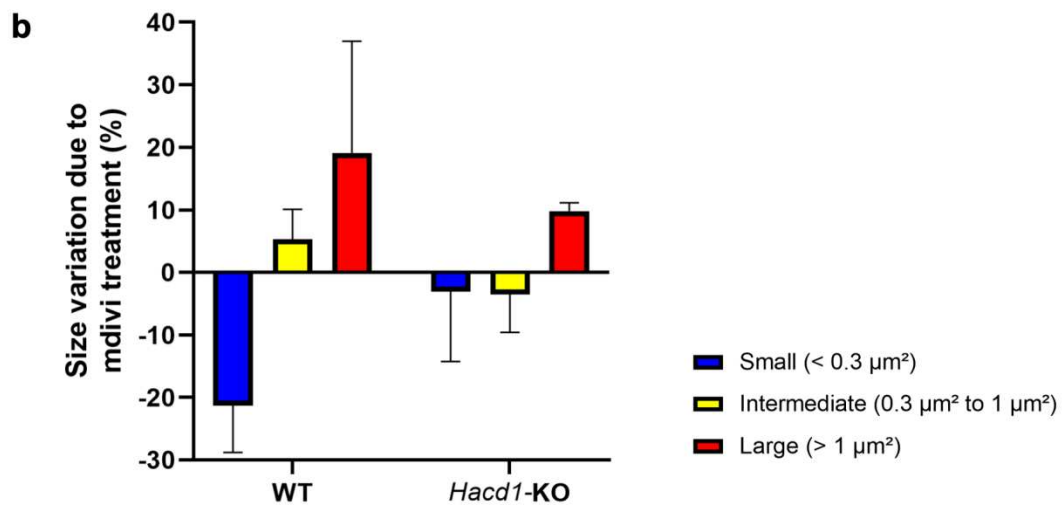


Figure 6 : Morphologie du réseau mitochondrial dans des myotubes primaires.

(a) Tableau des proportions de mitochondries dans des myotubes primaires de souris WT et *Hacd1*-KO en fonction de la taille, avec ou sans traitement par le mdivi1. (b) Pourcentage de variation par groupe de taille suite au traitement par le mdivi1

. * en comparaison aux contrôles non traités, \$ aux contrôles traités, £ aux individus *Hacd1*-KO sans traitement

individus WT et *Hacd1*-KO (**fig. 5-a**). Le traitement par le mdivi1 provoque dans les cellules WT une perte de petites mitochondries, avec un gain de mitochondries de tailles moyenne et grande (**fig. 5-a**), alors que les mitochondries des individus *Hacd1*-KO ne présentent aucune modification de morphologie en réponse à cette drogue. Ceci résulte après traitement en une forte différence de morphologie chez les individus *Hacd1*-KO comparés aux WT, avec notamment une plus forte quantité de petites mitochondries au détriment de mitochondries moyennes et grandes (**fig. 5-b**). Il semblerait donc que la faible expression d'*Hacd1* à ce stade soit suffisante pour provoquer un effet sur les mitochondries *Hacd1*-KO.

Pour confirmer cet effet dans des cellules exprimant *Hacd1*, nous avons réalisé cette expérience sur des myotubes issus de la différenciation de myoblastes. A ce stade, la fragmentation n'est pas encore visible chez les individus *Hacd1*-KO avant traitement (**fig. 6-a**), avec des classes de tailles équivalentes entre les individus de chaque génotype. Après traitement avec mdivi1, on remarque chez les WT une augmentation significative du nombre de grandes mitochondries au détriment des petites mitochondries (**fig. 6-a**) : on a donc bien une inhibition de la fission. Chez les individus *Hacd1*-KO, on observe une très légère variation (non significative) des mitochondries de petite et moyenne tailles, avec une augmentation significative des grandes mitochondries après traitement (**fig. 6-b**) ; cependant, l'effet est moins fort que chez les WT et ne touche que les grandes mitochondries, alors que les moyennes mitochondries n'augmentent pas (il semblerait donc que les petites mitochondries ne fusionnent que peu). Ceci pourrait s'expliquer par la compartimentalisation des mitochondries provenant de différentes cellules ayant fusionnées, comme cela a été démontré pour des myofibres matures (Mishra et al., 2015). Ainsi, les différentes parties composant le réseau mitochondrial ne seraient pas affectées avec la même intensité, provoquant éventuellement cette différence de phénotype.

Dans l'hypothèse d'une surfission du réseau mitochondrial, nous avons vérifié en parallèle l'intégrité de l'ADN mitochondrial (ADNmt). En effet, la fragmentation du réseau mitochondrial dû à un excès de fission est associée à une accumulation de mutations et grandes délétions dans l'ADNmt (Chen et al., 2010; Kondadi et al., 2019; Rapaport et al., 1998). Nous avons donc réalisé des extractions d'ADNmt dans des TA de souris âgées de 8 mois (mâles) et 22 mois (mâles et femelles) et amplifié celui-ci par l'utilisation d'une *Long-Range* PCR, qui repose sur une polymérase capable d'amplifier des fragments de plusieurs kb (ici 16,3). Suite à cette amplification, nous avons fait migrer ces fragments pour détecter la présence de grandes délétions (**fig. 7-a**). Celui-ci nous a permis de conclure à l'absence de grandes délétions chez les individus *Hacd1*-KO âgés. Les défauts dans la dynamique mitochondriale s'accompagnent aussi parfois d'une accumulation de nombreuses copies différentes de l'ADNmt dans les mitochondries. Nous avons réalisé sur les extraits d'ADNmt et ADN génomique (ADNg) précédents une qPCR permettant de quantifier le nombre de copies d'ADNmt par copie d'ADNg. Nous avons ainsi pu remarquer qu'à 8 mois (**fig. 7-b**) comme à 22 mois (**fig. 7-c-d**), les individus WT et *Hacd1*-KO possèdent le même ratio ADNmt/ADNg. Nous n'observons donc aucune différence entre WT et *Hacd1*-KO, suggérant qu'un excès de fission n'est pas probable. Il est intéressant de noter que nous observons bien

une réduction du nombre de copies avec l'âge chez les mâles de 22 mois comparé à ceux de 8 mois, comme précédemment décrit (Barazzoni et al., 2000; Zhang et al., 2017).

Ainsi, notre hypothèse principale reste, par analogie avec les myoblastes, qu'une modification de la composition membranaire des mitochondries (et notamment de la membrane externe) amènerait à un défaut de fusion de celles-ci, provoquant une fragmentation du réseau. Pour tester cette hypothèse en nous affranchissant de la complexité cellulaire, et en nous fondant principalement sur les propriétés membranaires, nous avons utilisé une méthode de fusion *in vitro* de mitochondries isolées d'individus WT et *Hacd1*-KO. Cette méthode permet de provoquer la fusion de mitochondries isolées en suspension dans un tampon favorisant une fusion idéale (Schauss et al., 2010); nous avons couplé cette technique à une étude en cytométrie avec des billes de tailles nanométriques pour pouvoir déterminer l'évolution de la taille des mitochondries. Avant fusion, les mitochondries isolées extraites des muscles totaux d'individus WT et *Hacd1*-KO présentaient la même répartition de taille (**fig. 8-a**). On plaçait ensuite les mitochondries dans le tampon de fusion, à 4°C (**fig. 8-b**, condition défavorable à la fusion de membranes) et à 37°C (**fig. 8-c**, condition idéale de fusion). On ajoutait alors du cytoplasme extrait de gastrocnémien WT dans le milieu de fusion (**fig. 8-d** à 4°C et **fig. 8-e** à 37°C), afin de favoriser la fusion (Schauss et al., 2010). Pour voir la fusion au cours du temps, on réalisait celle-ci sur des temps compris entre 5 et 30 min, on déterminait à chaque fois les tailles des mitochondries, et on représentait ceci sous forme d'un indice de mitochondries fusionnées rapportées au nombre de mitochondries non fusionnées. On voit ainsi qu'à 4°C, que ce soit avec (**fig. 8-b**) ou sans cytoplasme WT (**fig. 8-d**), les mitochondries ne fusionnaient pas au cours du temps. A 37°C, en absence de cytoplasme WT, les mitochondries WT et *Hacd1*-KO fusionnaient (**fig. 8-c**) avec un taux moyen de fusion similaire et selon la même cinétique. En présence de cytoplasme à 37°C, les mitochondries WT connaissaient un pic de fusion à 15 min (**fig. 8-e**) qui se stabilisait ensuite à une valeur légèrement inférieure ; quant aux *Hacd1*-KO, on observait une stabilisation à 30 min à une valeur similaire à celle du WT, mais avec une cinétique plus lente et progressive. De plus, les valeurs de fusion avec cytoplasme étaient inférieures à celles sans cytoplasme, appuyant le fait que le cytoplasme musculaire WT constitue un tampon idéal de fusion et confirmant l'influence de facteurs solubles dans le cytoplasme sur la fusion (Schauss et al., 2010).

Conclusion - discussion

L'étude précédente a mis en lumière que les individus *Hacd1*-KO ont un réseau mitochondrial fragmenté dans les fibres musculaires adultes de l'EDL. Or nous avons pu montrer que ceci n'était pas lié à un défaut des protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale. La morphologie mitochondriale résultant d'un processus dynamique et équilibré de fusion et de fission, nous avons cherché à comprendre si la composante provoquant la fragmentation était majoritairement une surfission ou un défaut de fusion.

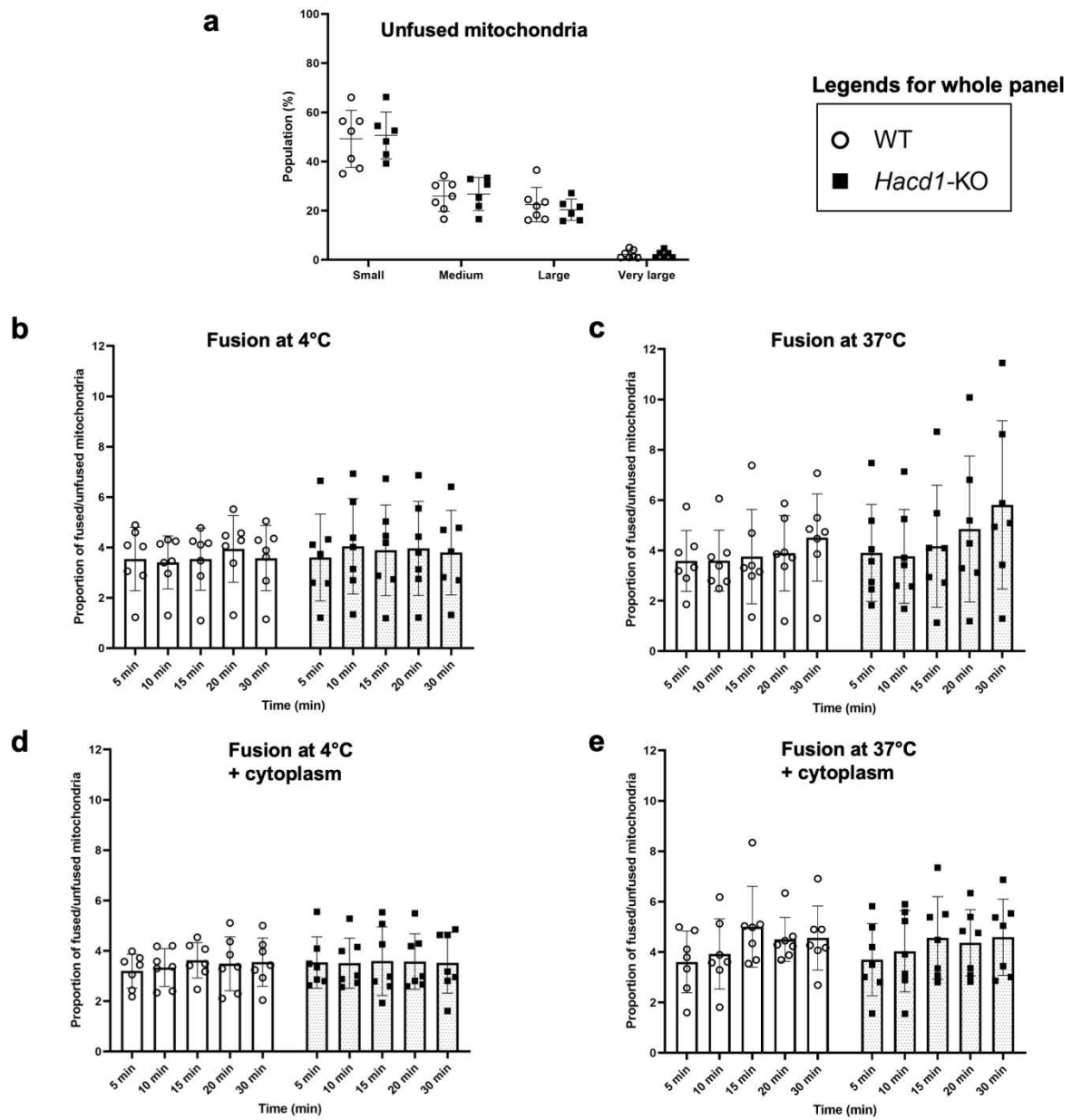


Figure 8 : Test de fusion mitochondriale *in vitro*.

(a) Proportion de mitochondries avant fusion par classes de taille déterminée par cytométrie. (b-e) Cinétique de fusion mitochondriale à 4°C (b), 37°C (c), 4°C + cytoplasme (d) et 37°C + cytoplasme (e).

Pour un même individu, les valeurs de chaque groupe de taille à un instant t sont normalisées aux valeurs du groupe de taille correspondant à $t=0$. L'index de fusion est déterminé par le ratio des mitochondries de tailles moyenne, grande et très grande sur les petites.

Pour évaluer la possibilité d'une surfission, nous avons utilisé diverses approches complémentaires. Premièrement, ce type de déséquilibre entraîne généralement des dommages de l'ADNmt sous forme de grandes délétions, voire d'accumulation du nombre de copies d'ADNmt par molécule d'ADNg (Chen et al., 2010; Kondadi et al., 2019; Rapaport et al., 1998): nous n'avons pas observé de telles modifications. Une vérification supplémentaire pour écarter complètement ce point serait de séquencer les différentes copies d'ADNmt afin d'évaluer l'hétéroplasmie, c'est-à-dire la coexistence de plusieurs versions différentes d'ADNmt au sein d'un même tissu.

Dans l'hypothèse d'une surfission, nous avons aussi traité des myoblastes primaires et différenciés avec mdivi1, un inhibiteur de fission. Les WT répondent de manière attendue au traitement, c'est-à-dire en perdant des petites mitochondries au profit des grandes et moyennes. Pour les *Hacd1*-KO différenciées, on a observé une augmentation uniquement des grandes et pas des moyennes, ce qui laisserait supposer qu'une partie des mitochondries pourraient ne pas être capables de fusionner, et resteraient donc petites. Ces observations semblent appuyer le fait que le processus de fragmentation ne serait pas dû à une surfission mitochondriale.

En parallèle, nous avons évalué l'éventualité d'un problème de fusion, qui pourrait être similaire à ce que l'on a observé pour les myoblastes (Blondelle et al., 2015). Cette hypothèse est étayée par le fait que la membrane externe mitochondriale est plus rigide chez les individus *Hacd1*-KO. A la lumière de cette observation, nous avons étudié la taille de mitochondries fusionnées *in vitro* et avons remarqué que la cinétique de fusion est ralentie chez les individus *Hacd1*-KO. L'effet observé appuie donc l'hypothèse d'une rigidité trop importante, ralentissant en partie la fusion. Cependant, la fusion est quand même de même ampleur à la fin du processus chez les WT et les *Hacd1*-KO, suggérant que le ralentissement observé n'empêche pas la fusion finale, et on n'observe pas de phénotype semblable à une fragmentation dans ce test *in vitro*. La différence entre les phénotypes *in vitro* et *in vivo* pourrait s'expliquer de plusieurs façons. Tout d'abord, nous avons réalisé cette expérience sur des mitochondries extraites de l'ensemble des muscles squelettiques, ce qui a peut-être provoqué une dilution des mitochondries affectées. De plus, il a pu y avoir en parallèle de la fusion des fissions mécaniques dues par exemple au pipetage ou à des vibrations lors du transport des échantillons vers le cytomètre. Enfin, peut-être que les échantillons ont une stabilité différente, et que les grandes mitochondries sont moins stables que les petites ; ainsi, nous sous-estimons peut-être la proportion de grosses mitochondries dans les échantillons. L'ajout de celui-ci a d'ailleurs un effet intéressant, puisqu'il semble ralentir la fusion chez les *Hacd1*-KO ; ce cytoplasme étant WT, il faudrait reproduire cette expérience en le remplaçant par du cytoplasme de souris *Hacd1*-KO afin d'étudier son impact. De plus, bien qu'ayant optimisé dans notre modèle la quantité de cytoplasme ajouté pour la fusion, il a été reporté que celui-ci était d'une importance majeure pour la fusion, et qu'il pouvait aussi bien jouer en tant qu'activateur qu'inhibiteur en fonction de sa concentration et de son origine (Schauss et al., 2010). Ainsi, il serait intéressant d'essayer divers cytoplasmes de muscles WT ou *Hacd1*-KO afin de voir leur effet. Nous pourrions aussi essayer de fusionner des mitochondries WT

et *Hacd1*-KO afin de voir si l'effet du cytoplasme WT serait le même dans le cas de ces hybrides.

Il ressort de cette étude que la fragmentation, qui est le résultat de deux processus opposés, est peut-être liée à un défaut d'élimination de mitochondries altérées qui fissionnent avant dégradation, et qui s'accumulerait faute de machinerie efficace. Or, nous n'avons pas vu de modification de l'expression de protéines majeures de l'autophagie, ce qui laisserait supposer qu'un défaut d'autophagie ne puisse être envisagé ; il faudrait cependant aussi vérifier que les protéines sont bien localisées dans la cellule. De plus, sachant que ce processus est lui-même sujet à une fusion entre mitochondries et autophagosomes, puis avec des lysosomes, il pourrait y avoir une mitophagie altérée par défaut de composition membranaire de ces structures. Cependant, sur les nombreuses images de microscopie électronique observées, nous n'avons jamais observé de mitochondries bloquées dans des autophagosomes, ce qui appuie un peu plus l'idée que la mitophagie n'est pas altérée.

Afin d'éclaircir ces points, plusieurs expériences sont en cours. Premièrement, une visualisation de la dynamique mitochondriale sur myotubes primaires transformés avec des vecteurs exprimant des protéines mitochondriales fluorescentes est en cours. Elle nous permettra d'évaluer la quantité d'évènements de fusion et fission, mais aussi le déplacement moyen des mitochondries. Nous mettons aussi au point une étude similaire sur fibres adultes dissociées manuellement à partir d'un muscle, et marquées en mitotracker vert. De plus, une étude lipidomique sur la membrane externe mitochondriale est en cours afin de permettre de déterminer sa composition. Ainsi, nous envisageons d'enrichir ou diluer *in vitro* les éventuels phospholipides en proportions déséquilibrées, afin de voir si ceci pourrait modifier le comportement mitochondrial, notamment dans le cadre de fusion *in vitro* avec cytoplasme. Enfin, les expériences de traitement sur myoblastes différenciés et non différenciés avec traitement mdivi1 vont être répétées pour augmenter le nombre d'individus.

Ma contribution

J'ai mené l'ensemble des expérimentations nécessaires à la réalisation de cette partie de résultats.

CHAPITRE 2 : DECOUPLAGE ENTRE LE PHENOTYPE

DEVELOPPEMENTAL ET LE PHENOTYPE METABOLIQUE CHEZ LES SOURIS HACD1-KO

Dans ce chapitre, nous proposons de tenter une dissociation entre l'aspect musculaire délétère (la myopathie), et l'aspect métabolique, notamment la protection contre la prise calorique et l'élévation du métabolisme basal au niveau musculaire. En effet, ce deuxième aspect de la délétion d'*Hacd1* constitue une opportunité de traitement des syndromes métaboliques qui, jusque-là, ont une cible restreinte au tissu adipeux brun ou, au contraire, à l'organisme entier, ce qui a pu révéler par le passé des effets secondaires graves et délétères (CUTTING et al., 1933; TAINTER et al., 1933). Nous présentons dans une première partie les résultats d'une étude de diminution d'*Hacd1* dans le muscle par une stratégie de KO conditionnel, puis ceux d'une stratégie envisageable dans le cadre d'un traitement, par inactivation *via* un Virus Adéno-Associé (AAV). L'idée a en effet été d'essayer de reproduire le phénotype métabolique lié à la perte de fonction d'*Hacd1* à l'âge adulte, de manière à s'affranchir de l'hypotrophie musculaire induite par l'inactivation précoce d'*Hacd1* (Blondelle et al., 2015). Ce contexte peut ainsi permettre d'évaluer la part de l'hypotrophie musculaire

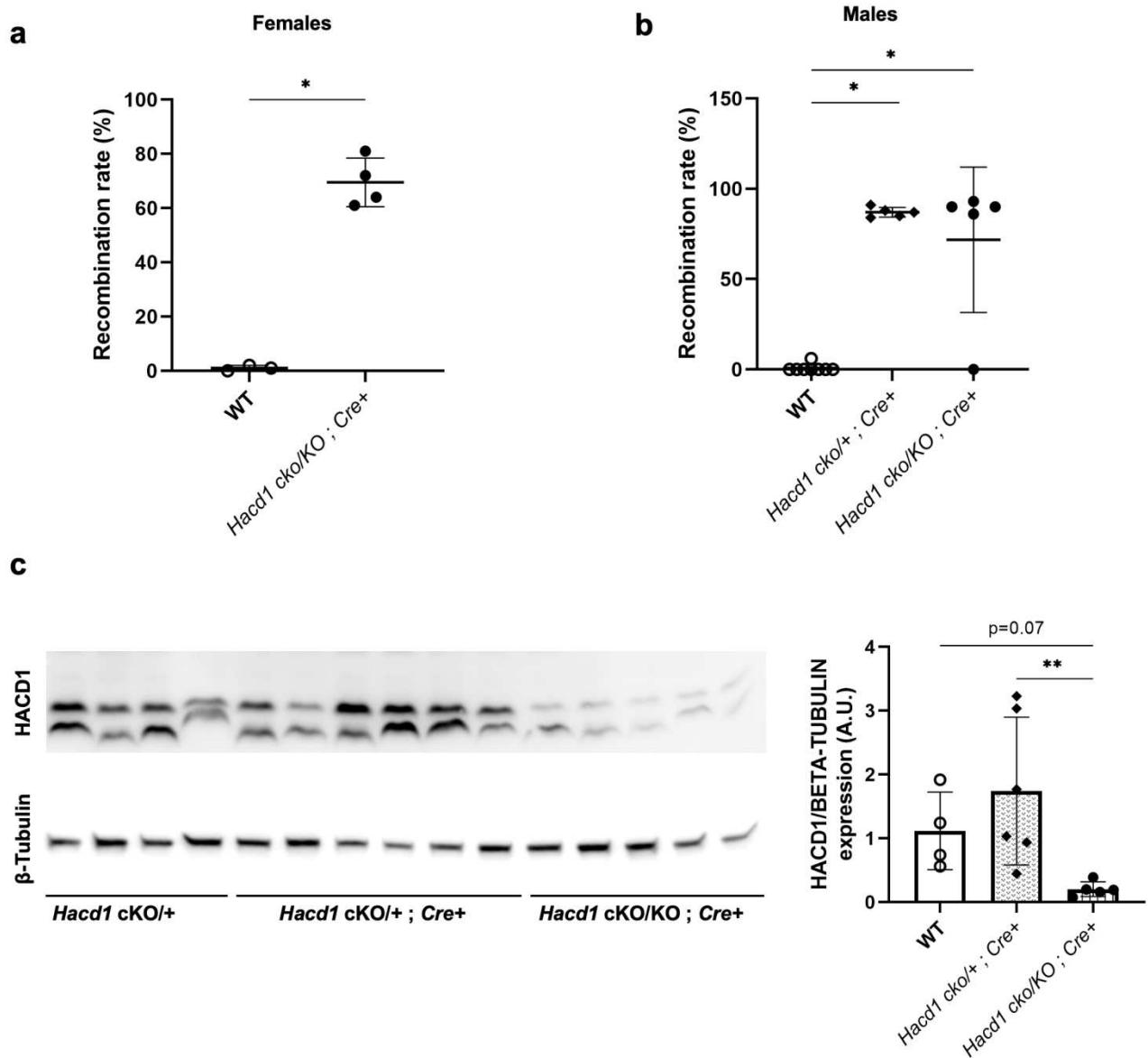


Figure 9 : Validation de la délétion d'*Hacd1* par knockout conditionnel à l'âge adulte après recombinaison.

(a-b) Taux de recombinaison évalué par qPCR chez les individus femelles (a) et mâles (b) dans le *tibialis anterior* après recombinaison induite par le tamoxifène. (c) Western blot quantifié de la quantité d'HACD1 normalisée à la bêta tubuline dans des extraits de *tibialis anterior* de souris mâles après recombinaison.

cko = allèle conditionnel de recombinaison

RESULTATS 3 : INVALIDATION GENETIQUE A L'AGE ADULTE DU GENE *HACD1* PAR L'UTILISATION D'UN ALLELE DE RECOMBINAISON CONDITIONNELLE

Problématique

La perte de fonction du gène *Hacd1* provoque à la fois une myopathie et une élévation du métabolisme basal par augmentation de la bêta-oxydation et de la respiration mitochondriale spécifiquement dans le muscle, par défaut de couplage mitochondrial. Dans le contexte actuel mondial, où l'obésité est devenue un problème de santé publique, la possibilité de réduire localement le couplage pour un effet global sur l'organisme serait un véritable atout dans la lutte contre l'obésité. Cependant, provoquer l'apparition d'une myopathie serait grandement délétère, surtout chez des patients qui sont déjà pour la plupart sédentaires. Notre laboratoire a donc voulu tester une approche de dissociation de ces deux phénotypes, en activant la perte d'*Hacd1* après le développement musculaire, espérant ainsi reproduire l'effet métabolique sans l'hypotrophie musculaire, d'origine développementale. Pour cela, nous avons voulu réaliser un modèle de KO conditionnel (cKO) inductible dans le muscle par une Cre recombinase Cre-ERT2, sous contrôle du promoteur *Human Skeletal Actin (Hsa)* et dont la translocation nucléaire était induite par le tamoxifène. L'allèle floxé au locus *Hacd1*, pouvant subir la recombinaison, sera appelé *Hacd1*-cKO.

Résultats

Pour étudier l'invalidation du gène *Hacd1* à l'âge adulte, nous avons constitué un lot comprenant des souris WT avec et sans la Cre-ERT2 (*Hacd1*^{+/+} et *Hacd1*^{+/+} ; Cre+), des souris hétérozygotes avec et sans la Cre (*Hacd1*^{KO/+}, *Hacd1*^{cKO/cKO} et *Hacd1*^{KO/+} ; Cre+) et enfin des souris du génotype d'intérêt, qui donnera un KO d'*Hacd1* dans le muscle squelettique après recombinaison, les *Hacd1*^{KO/cKO} ; Cre+. Tous ces animaux étaient frères et sœurs de portées.

Nous avons vérifié l'efficacité de la recombinaison chez les femelles - qui avaient reçu le tamoxifène par gavage - et les mâles - qui avaient ingéré de la nourriture contenant du tamoxifène. Chez les femelles, nous avons observé un taux de recombinaison en moyenne de 70% (**fig. 9-a**), avec des valeurs minimales à 60%. Quant aux mâles, nous arrivons à un taux de recombinaison de l'allèle *Hacd1*-cKO de plus de 80%, à l'exception d'un individu *Hacd1*^{KO/cKO} ; Cre+ qui n'a pas recombiné (**fig. 9-b**). Nous avons donc un taux de recombinaison élevé. Sachant qu'aucune étude n'a pour le moment été réalisée sur la demi-vie de la protéine HACD1, supposée très stable puisque intramembranaire, nous avons vérifié par western blot la présence de la protéine à trois mois après ingestion du tamoxifène. Nous avons remarqué une expression réduite au moins de 80% chez les individus *Hacd1*^{KO/cKO} ;

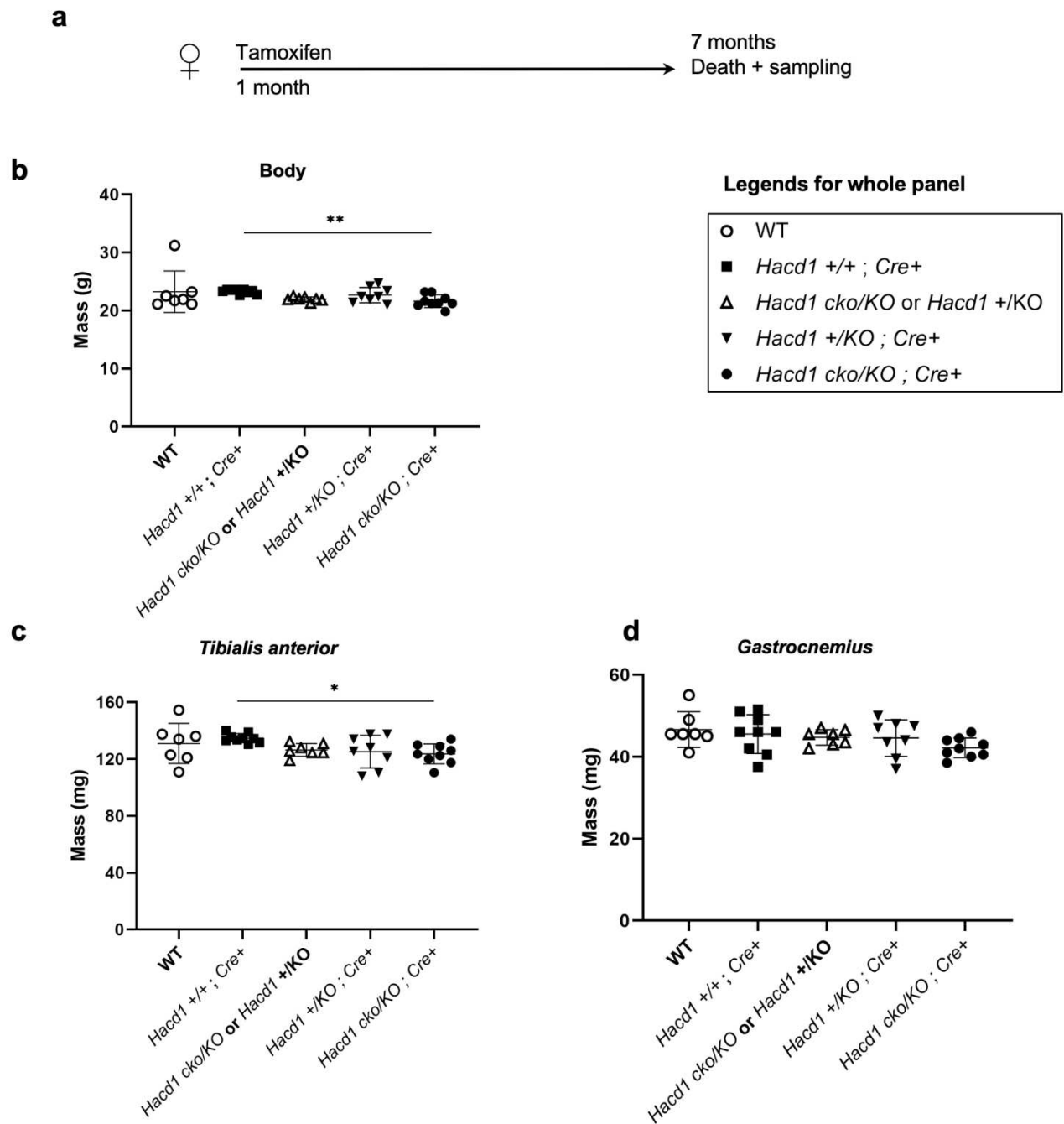


Figure 10 : Etude de la délétion d'*Hacd1* à l'âge adulte chez les individus femelles.

(a) Chronogramme des expériences sur les femelles pour tester l'inactivation du gène *Hacd1* à l'âge adulte. (b-d) Masse corporelle (b), masse du *tibialis anterior* (c) et du gastrocnémien (d) dans les différents groupes.

cKO = allèle conditionnel de recombinaison

Figure 10 : Etude de la délétion d'*Hacd1* à l'âge adulte chez les individus femelles

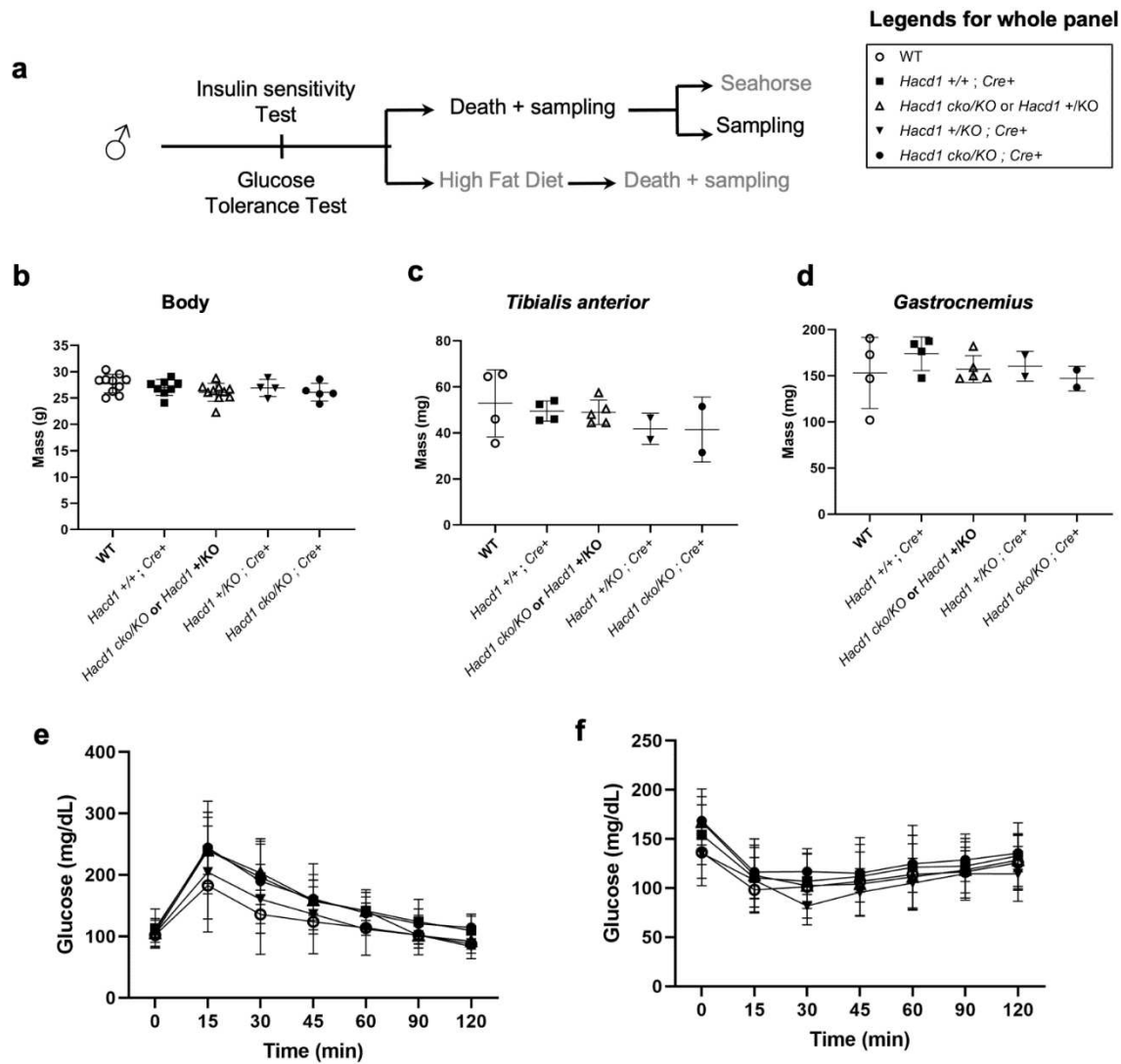


Figure 11 : Etude de la délétion d'*Hacd1* à l'âge adulte chez les individus mâles – Métabolisme du glucose et masse musculaire.

(a) Chronogramme des expériences sur les mâles pour tester l'inactivation du gène *Hacd1* à l'âge adulte. (b-d) Masse corporelle (b), masse du *tibialis anterior* (c) et du gastrocnémien (c). (e-f) Test de tolérance au glucose (e) et de sensibilité à l'insuline (f) dans les différents groupes.

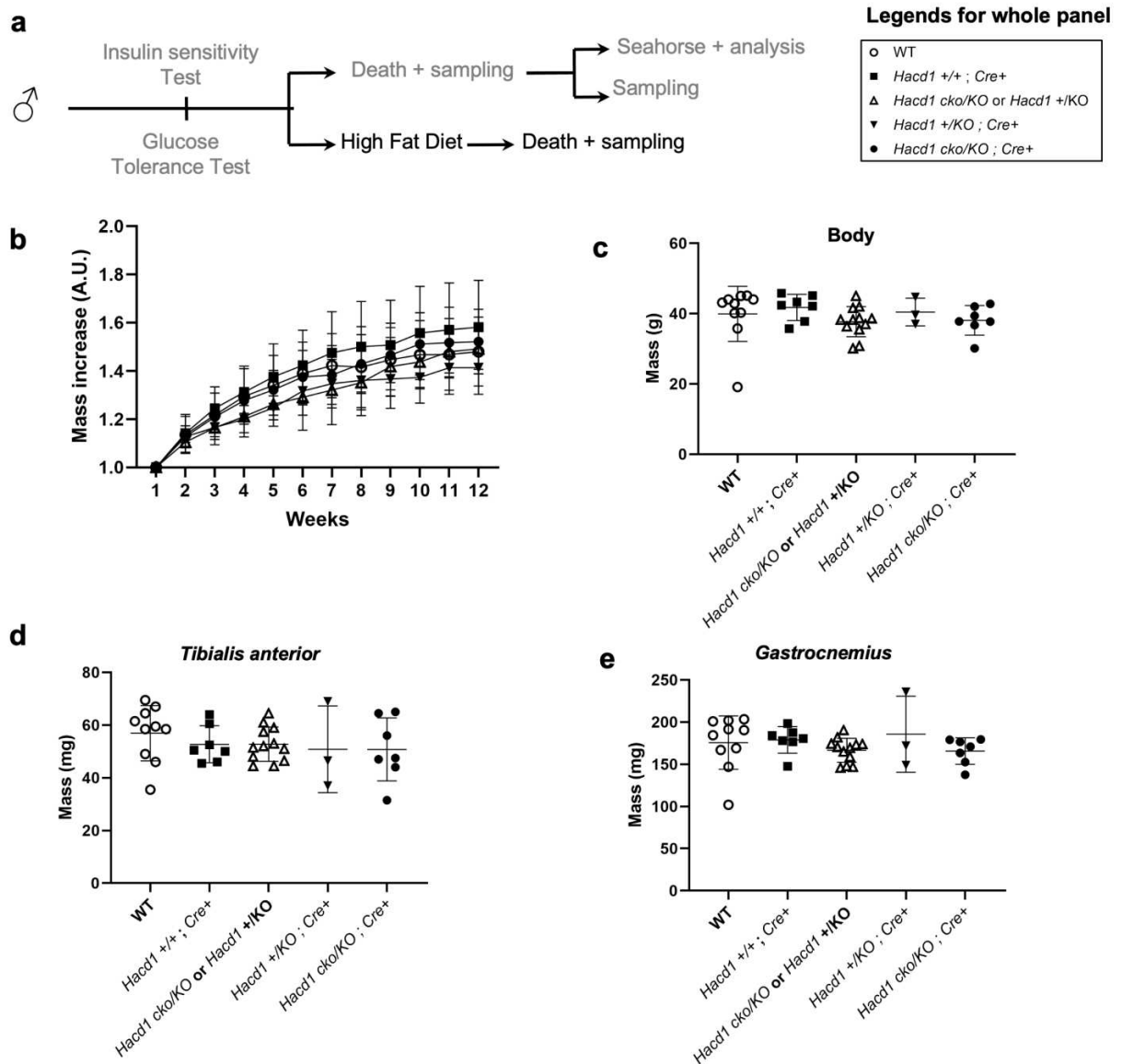


Figure 12 : Etude de la délétion d'*Hacd1* à l'âge adulte chez les individus mâles – Métabolisme énergétique lors d'un régime riche en graisse.

(a) Chronogramme des expériences sur les mâles pour tester l'inactivation du gène *Hacd1* à l'âge adulte sur la protection contre l'obésité en réponse à un régime riche en graisse (HFD). (b) Evolution de la masse des individus lors des 12 semaines en HFD par rapport à leur masse initiale à la semaine 1. (c-e) Masse corporelle (c), masse du *tibialis anterior* (d) et du gastrocnémien (e) à l'issue de ces 12 semaines.

Cre+ par rapport aux individus *Hacd1^{cKO/+}* et *Hacd1^{cKO/+}* ; Cre+ (**fig. 9-c**). Nous avons ainsi confirmé qu'HACD1 était bien réduite chez les individus *Hacd1^{KO/cKO}* ; Cre+ à ce stade.

Les femelles ont été euthanasiées à 7 mois (**fig. 10-a**). La pesée a montré des masses corporelles homogènes au sein des différents groupes, excepté pour les individus *Hacd1^{KO/cKO}* ; Cre+ qui étaient très légèrement inférieurs aux individus *Hacd1^{+/+}* ; Cre+ (**fig. 10-b**). Nous avons retrouvé le même profil pour la pesée des TA (**fig. 10-c**), alors que les gastrocnémiens ne présentaient aucune différence quel que soit le groupe considéré (**fig. 10-d**). Il semblerait donc que chez les femelles, nous ayons bien, comme attendu, une masse musculaire normale suite à l'invalidation d'*Hacd1* à l'âge adulte.

De même, chez les mâles (**fig. 11-a**), la masse corporelle des différents groupes d'individus était identique (**fig. 11-b**), ainsi que la masse du TA (**fig. 10-c**) et du gastrocnémien (**fig. 10-d**), appuyant le fait que la masse musculaire est préservée lors d'une invalidation du gène *Hacd1* à l'âge adulte.

Nous nous sommes alors intéressés aux aspects qui constituent l'intérêt du projet, c'est-à-dire le pendant métabolique du phénotype. Ainsi, nous avons mesuré leur glycémie en réponse à une injection de glucose (test de tolérance au glucose, **fig. 11-e**) et en réponse à une injection d'insuline (test de sensibilité à l'insuline, **fig. 11-f**). Ces deux tests ont montré qu'il n'y avait pas de différence entre les différents groupes, suggérant un métabolisme énergétique identique. Puis, nous avons soumis les individus de chaque groupe à un régime riche en graisses (*High fat diet*, HFD) pendant 12 semaines (**fig. 12-a**). Tous les groupes ont présenté une prise de masse au cours du temps, atteignant à la 12ème semaine +40% à +60% de leur masse initiale (**fig. 12-b**). Cependant, aucune différence significative de la masse corporelle, que ce soit lors des semaines de HFD (**fig. 12-b**) ou au moment des prélèvements (**fig. 12-c**), ou encore de la masse du TA (**fig. 12-d**) et du gastrocnémien (**fig. 12-e**) n'a été visible entre les différents groupes, malgré un nombre important d'individus par groupe. Nous avons enfin évalué en détail la respiration mitochondriale (**fig. 13-a**) couplée (**fig. 13-b**), non couplée (**fig. 13-c**) et le ratio de ces valeurs, qui donnent une valeur de couplage (**fig. 13-d**). Tous ces paramètres n'ont montré aucune différence en fonction des groupes, ce qui sous-tend une absence de phénotype mitochondrial dans notre approche d'invalidation d'*Hacd1* à l'âge adulte et explique l'absence de phénotype métabolique global observée.

Conclusion -discussion

L'étude que nous avons menée par une délétion à l'âge adulte de *Hacd1* visait à mimer ce qui pourrait être mis en place dans le cas d'un traitement de syndrome métabolique. Nous présentons ici un modèle d'induction génétique de perte d'*Hacd1*, par recombinaison induite par la Cre-ERT2. Nous avons pu observer un fort taux de recombinaison chez les individus femelles comme mâles, qu'ils aient reçu le tamoxifène - inducteur de la translocation nucléaire de la Cre - par gavage ou dans leur nourriture. Il est à garder en tête que ce taux est en réalité d'autant plus important que nous réalisons la PCR de quantification de la

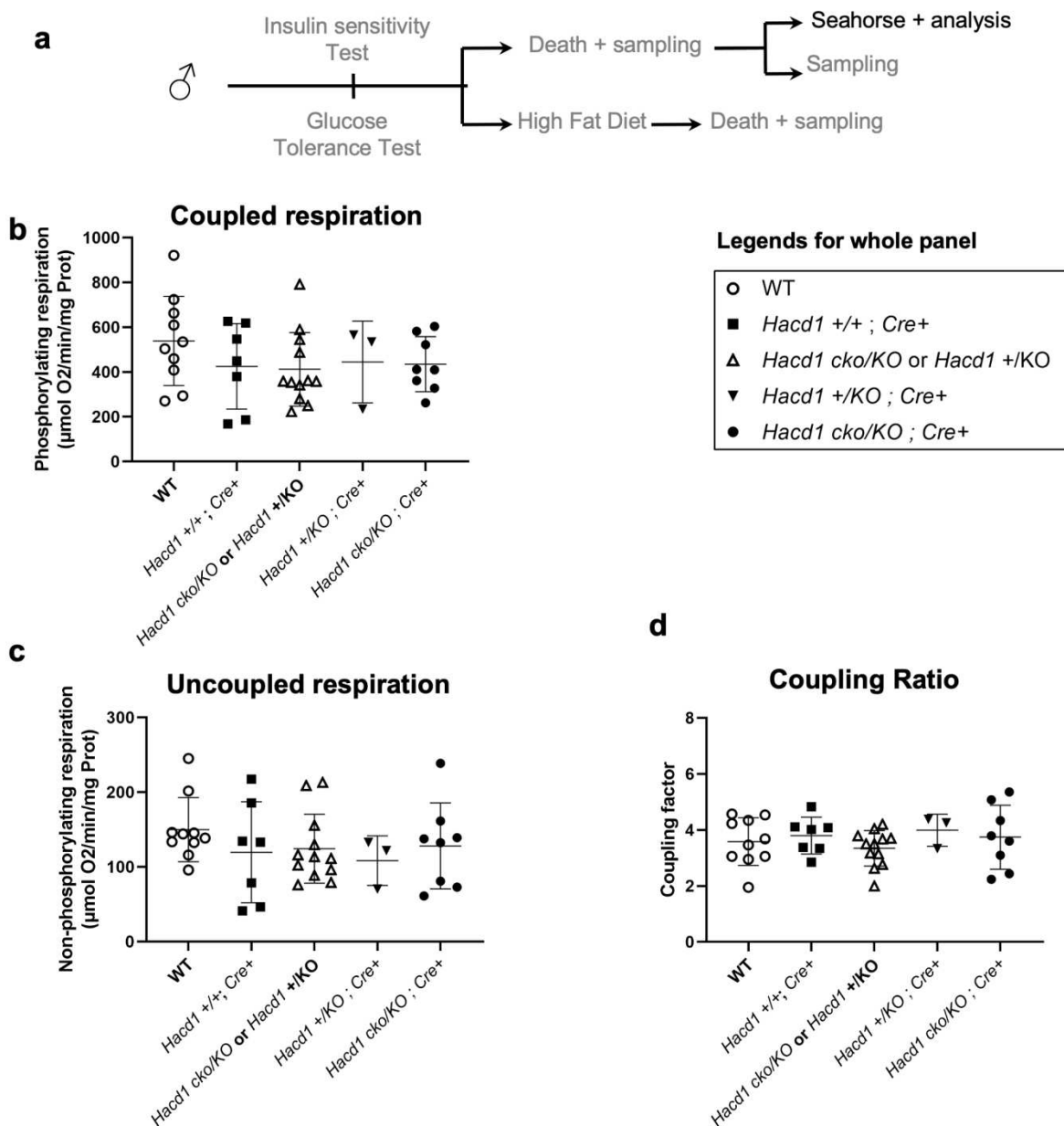


Figure 13 : Etude de la délétion d'*Hacd1* à l'âge adulte chez les individus mâles – Fonction mitochondriale.

(a) Chronogramme des expériences sur les mâles pour tester l'effet de l'inactivation du gène *Hacd1* à l'âge adulte sur la respiration mitochondriale. (b-d) Evaluation sur extrait musculaire de *tibialis anterior* de la respiration mitochondriale couplée (b) et non couplée (c) et ratio de couplage mitochondrial correspondant (d).

recombinaison sur muscle entier ; or celui-ci est en partie composé d'autres types cellulaires (fibroblastes, cellules vasculaires, *etc.*), dans lesquelles le promoteur *Hsa* est inactif et qui ne sont donc pas sujets à la recombinaison. Nous sous-évaluons donc légèrement notre taux de recombinaison, qui doit être proche de 100% dans les fibres musculaires.

Les souris invalidées pour *Hacd1* à l'âge adulte, ayant fini leur développement musculaire, ne présentent pas de réduction de masse musculaire, comme attendu. Cependant, elles ne présentaient aucune altération métabolique, pourtant attendue vu le phénotype à l'âge adulte de la perte d'*Hacd1* constitutive. Deux hypothèses pourraient expliquer cette absence de phénotype. Il pourrait s'agir d'un effet secondaire de la présence de la protéine Cre, parfois toxique dans certains organes comme le cœur (Rehmani et al., 2019). Cependant cette lignée est largement utilisée en myologie et aucun effet de ce type n'a jusque-là été rapporté. Un autre effet extérieur était l'ingestion de tamoxifène, par tous les groupes. Récemment, plusieurs études ont mis en évidence l'influence positive du tamoxifène sur la myopathie de Duchenne et la myopathie myotubulaire chez la souris (Dorchies et al., 2017, 2013; Gayi et al., 2018; Maani et al., 2018). Ainsi, l'absence de phénotype observé chez les individus *Hacd1^{KO/cKO}* ; Cre⁺ était peut-être due à l'influence de cette molécule qui agit comme un agoniste des œstrogènes dans le muscle, ce qui appuierait un effet hormonal de la protection contre le phénotype puisque seuls les mâles *Hacd1*-KO présentent un phénotype métabolique à l'échelle de l'organisme.

Si cette étude ne nous a pas permis de reproduire le phénotype métabolique lié à l'invalidation du gène *Hacd1*, elle nous a permis d'émettre l'hypothèse que le tamoxifène pourrait être une piste thérapeutique pour les patients atteints d'une mutation du gène *HACD1*. Une étude destinée à tester l'effet du tamoxifène chez les souris *Hacd1*-KO va être prochainement menée au laboratoire.

En parallèle, pour répondre à notre question initiale, nous allons reproduire cette étude dans un modèle inductible non pas par le tamoxifène mais par la doxycycline (Rao and Monks, 2009), qui n'interfère pas avec le fonctionnement musculaire *a priori*. Si cette étude s'avère concluante quant à la protection contre l'obésité, elle sera reproduite sur des animaux rendus obèses par HFD avant l'induction de la délétion d'*Hacd1* pour tester le potentiel non plus seulement préventif mais aussi curatif de la perte de fonction d'*Hacd1* sur l'obésité.

Ma contribution

J'ai mené l'ensemble des expérimentations nécessaires à la réalisation de cette partie de résultats.

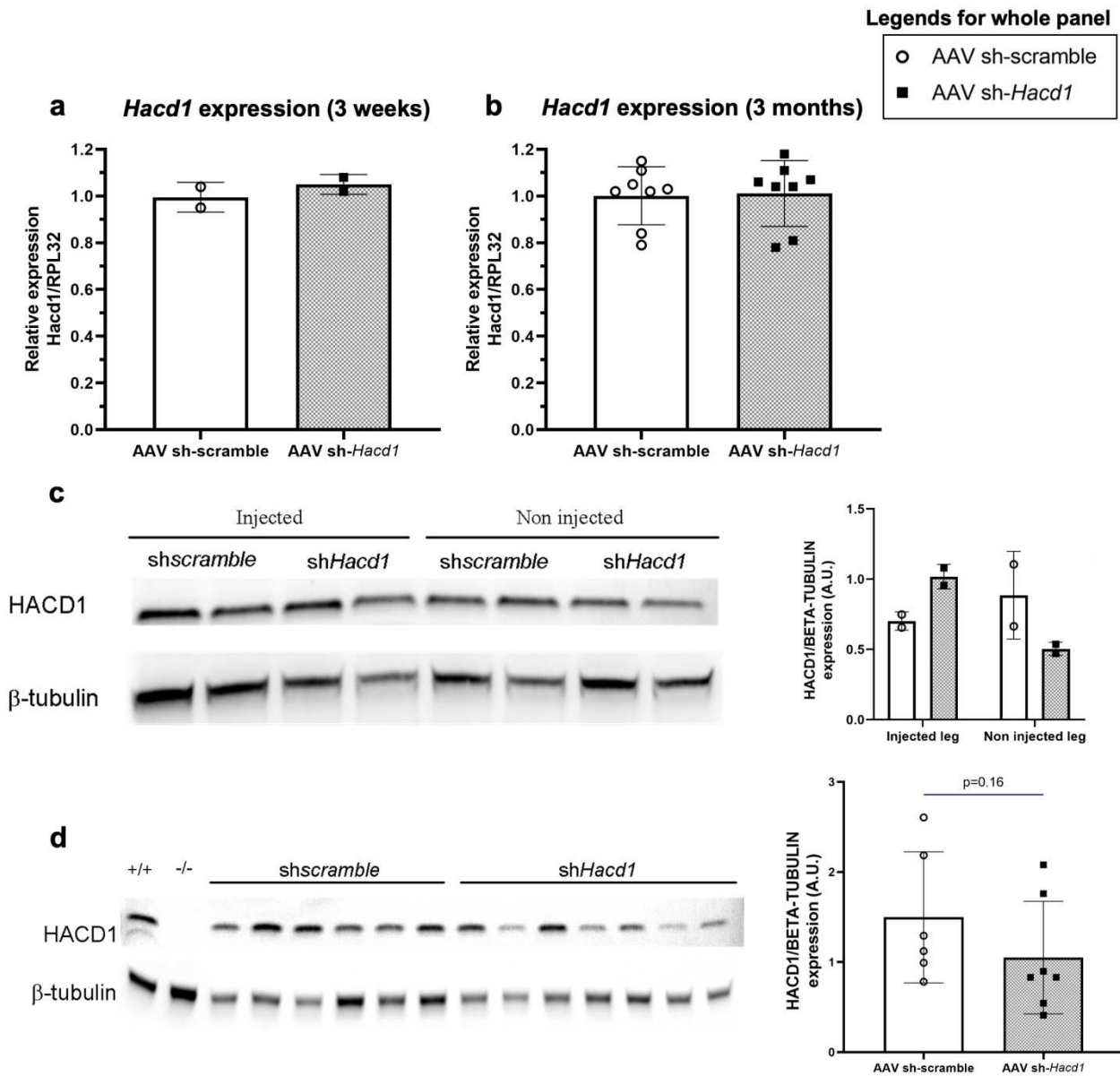


Figure 14 : Vérification de l'inactivation d'*Hacd1* à trois semaines et à trois mois après injection d'un AAV-shRNA.

(a-b) RT-qPCR pour le gène *Hacd1*, normalisé sur le gène rapporteur *Rpl32*, à trois semaines (a) et trois mois (b) post-injection avec un AAV contenant un sh-scramble ou un sh-*Hacd1*, sur des extraits de *tibialis anterior* de souris mâles WT. Western blot quantifié de la protéine HACD1 à trois semaines (c) et à trois mois (d) post-injection sur des extraits de *tibialis anterior* de souris adultes.

+/+ = WT ; -/- = *Hacd1*-KO.

RESULTATS 4 : INVALIDATION DU GENE *HACD1* A L'AGE ADULTE PAR L'UTILISATION D'UNE STRATEGIE AAV – EXPERIENCE PILOTE AVEC INJECTION INTRAMUSCULAIRE

Problématique

Dans l'objectif d'invalider *Hacd1* après la fin du développement musculaire, nous avons aussi envisagé une stratégie faisant intervenir un vecteur viral ciblant le muscle et contenant un *silencer* d'*Hacd1* via un *short-hairpin* (ou sh)-RNA. En effet, la stratégie précédente, avec un KO génétique, ne peut pas constituer un traitement envisageable, contrairement à une délivrance d'un vecteur via un virus génétiquement modifié et ciblé au muscle.

Une telle stratégie demande une quantité importante de virus, dont la production est un processus long et coûteux ; nous présentons donc ici une étude pilote menée afin de déterminer l'efficacité du traitement. Nous pourrions ensuite envisager un traitement global avec injection systémique d'un virus ciblant tous les muscles squelettiques des individus.

Résultats

Pour mener cette étude pilote, nous avons collaboré avec l'équipe de Sofia Benkhelifa à l'Institut de Myologie (Paris) pour la production de particules virales d'un AAV ciblant le muscle et exprimant une séquence de sh-RNA contre *Hacd1* que nous avons eu l'occasion de valider préalablement (Blondelle et al., 2015). Nous avons constitué un lot de souris WT dont certaines recevaient une injection de virus contenant le sh-RNA ciblant le gène *Hacd1* (dénommé AAV sh-*Hacd1*) et d'autres un virus ayant un sh-RNA ne ciblant aucune zone du génome, appelé AAV sh-*scramble*. Les individus ont été injectés dans le TA et le gastrocnémien de la patte droite, les muscles de la patte gauche servant ainsi de contrôle interne non injecté. Sans étude de la stabilité de la protéine HACD1, nous avons décidé de mettre deux temps d'arrêt pour nos expériences, à trois semaines et à trois mois suivant l'injection.

Nous avons d'abord vérifié l'expression du gène *Hacd1* par RT-qPCR (**fig. 14-a, b**) mais ces deux temps n'ont montré aucune différence entre les souris ayant reçu le sh-*scramble* et le sh-*Hacd1*. Nous avons aussi réalisé un western blot sur des extraits protéiques de TA. A trois semaines, nous n'avons vu aucune différence d'expression entre les deux AAV, ni entre les pattes injectées et les pattes contrôles (**fig. 14-c**). A trois mois, on a observé une forte tendance à la réduction de l'expression d'HACD1 dans le TA (**fig. 14-d**) chez les souris ayant reçu le sh-*Hacd1* comparées à celles avec le sh-*scramble*. Nous avons ainsi pu confirmer que le traitement permet une réduction de la protéine localement dans le muscle.

Nous avons effectué un suivi des animaux post-injection, notamment en évaluant leur évolution de poids (données non montrées) lors des semaines suivant l'injection. Nous avons

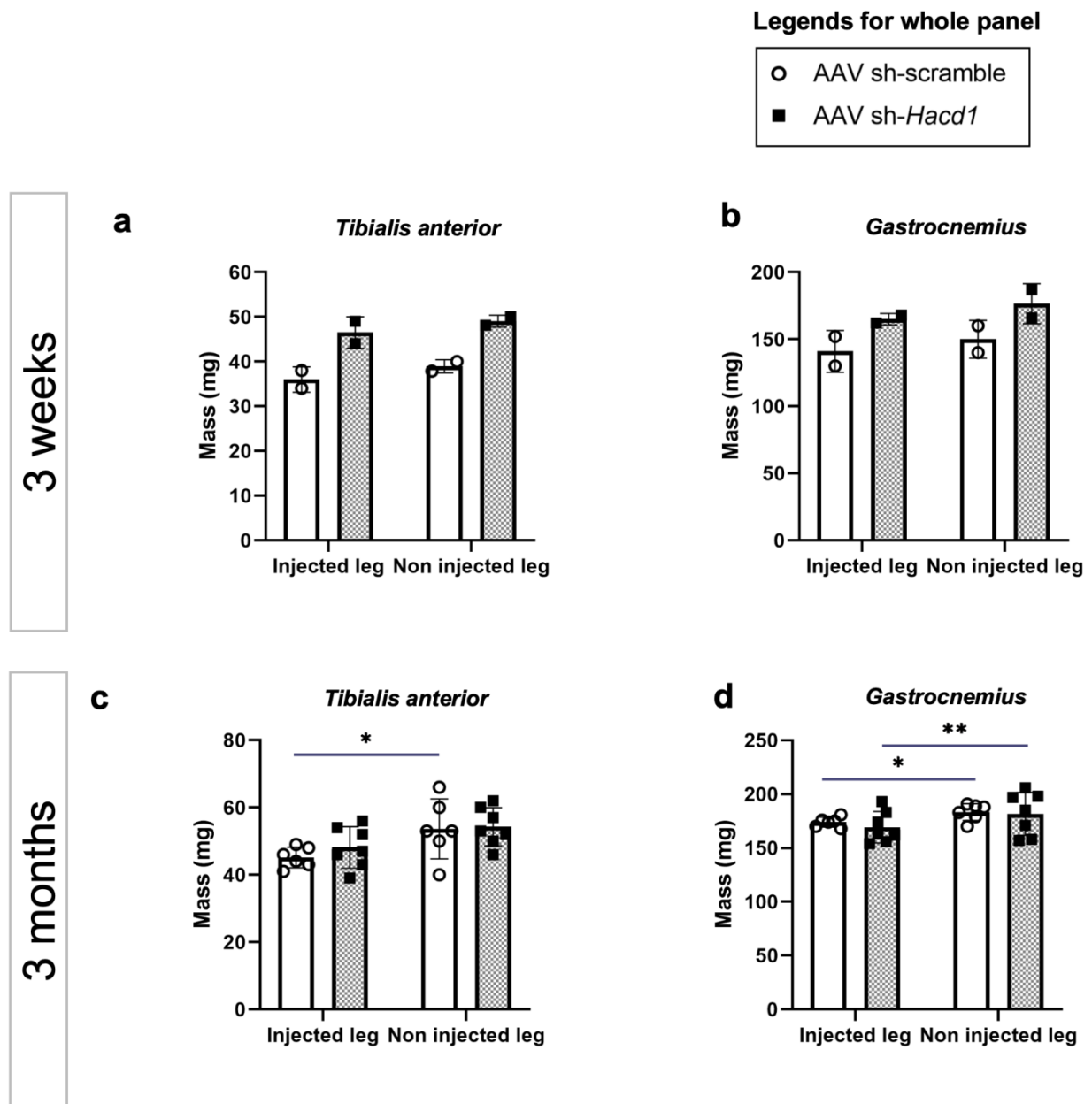


Figure 15 : Effet de l'invalidation d'*Hacd1* par un AAV-shRNA sur les masses corporelle et musculaire.

(a-d) Masses du *tibialis anterior* et du gastrocnémien à 3 semaines (respectivement a et b) et à trois mois (respectivement c et d) post-injection chez des mâles WT avec un AAV contenant un sh-*scramble* ou un sh-*Hacd1*.

ainsi pu confirmer qu'il n'y avait aucune différence entre nos deux groupes, et donc pas de perte de poids liées à l'injection.

Plus particulièrement, nous avons pesé les muscles TA et gastrocnémien pour vérifier l'effet de l'injection d'une part, et de l'inactivation d'*Hacd1* d'autre part. A trois semaines, suite à l'euthanasie d'un individu à la suite de blessures, le nombre d'individus injectés n'était que de 2, ce qui ne permet aucune conclusion solide. On note néanmoins que les individus injectés avec le sh-*Hacd1* avaient une masse légèrement supérieure pour le TA et le gastrocnémien, pour les deux pattes (injectée et contrôle) (**fig. 15-a et 15-b**). A trois mois post-injection, nous avons observé une réduction significative de la masse du TA injecté avec le sh-*scramble* par rapport à son contrôle, ainsi qu'une tendance similaire pour le TA injecté avec le sh-*Hacd1* (**fig. 15-c**). Nous avons observé dans le gastrocnémien un profil similaire (**fig. 15-d**), avec une réduction significative des muscles injectés par rapport à leur contrôle interne, quel que soit l'AAV injecté. Il s'agissait toutefois d'une faible réduction de masse.

Nous avons finalement étudié la respiration mitochondriale sur des fibres isolées perméabilisées de TA (**fig. 16**). A trois semaines, nous n'avons observé aucune différence entre les différents groupes, que ce soit au niveau de la respiration couplée (**fig. 16-a**), découplée (**fig. 16-b**) ou au niveau de leur ratio, représentatif du couplage (**fig. 16-c**). A trois mois, la respiration couplée était inchangée entre les muscles injectés (quelle que soit l'injection) entre eux, les pattes contrôles entre elles, mais aussi entre les pattes injectées et contrôles (**fig. 16-d**). Par contre, la respiration non couplée était augmentée dans les pattes injectées avec le sh-*Hacd1* (**fig. 16-e**). Ces observations amènent à pour les pattes contrôles à un couplage diminué dans les pattes injectées avec le sh-*Hacd1* par rapport à celles injectées avec le sh-*scramble* (**fig. 16-f**).

Conclusion - discussion

La stratégie thérapeutique adoptée par l'utilisation d'AAV dans cette étude pilote est d'intérêt puisque c'est une thérapie directement transposable à un traitement pour les patients.

Un fait étonnant a été l'absence de réduction des ARNm suite à l'injection du sh-*Hacd1* alors qu'il y a eu une réduction de l'expression de la protéine HACD1. Il est possible que cet effet soit dû à l'extraction d'ARNm qui n'a été faite que sur une partie du muscle, peut-être pas celle injectée (il est en effet prouvé que le virus diffuse assez peu). Il est aussi possible que notre construction ne permette pas la dégradation de l'ARNm mais inhibe plutôt sa traduction, même si cela ne serait pas concordant avec son effet dans des myoblastes en culture (Blondelle et al., 2015). De même, il existe une hétérogénéité de réduction du niveau d'HACD1 en fonction des individus. Ceci peut aussi être dû à la partie du muscle utilisée pour extraire les protéines, ou bien à une stabilité légèrement différente chez les individus de la protéine dont le turnover serait plus ou moins rapide. Il nous faudrait regarder à un temps plus long pour vérifier cet effet. Enfin, ceci peut être tout simplement une erreur technique lors de l'injection, puisque celle-ci s'effectue à travers la peau sans visibilité du muscle.

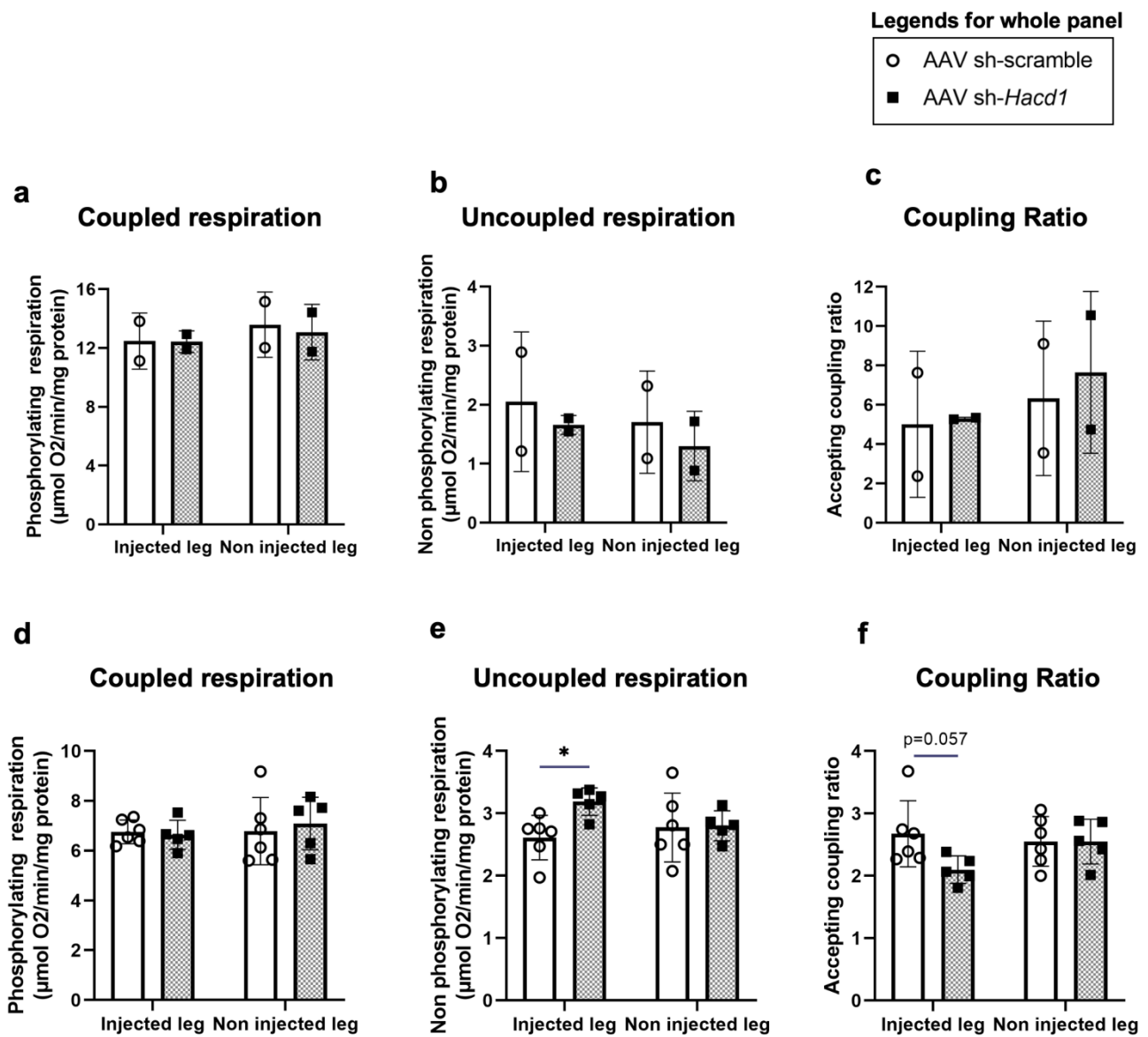


Figure 16 : Effet de l'inactivation d'*Hacd1* par un AAV-shRNA sur la respiration mitochondriale.

(a-c) Trois semaines et trois mois (d-f) après injection, évaluation sur fibres perméabilisées de gastrocnémien superficiel de la respiration mitochondriale couplée (respectivement a et d) et non couplée (respectivement b et e) et ratio de couplage mitochondrial correspondant (respectivement c et f).

Cependant, l'effet métabolique, qui est l'effet recherché par cette approche semble prometteur à trois mois. Cette approche laisse ainsi espérer un traitement prometteur dans le cadre des traitements des syndromes métaboliques. En effet, un découplage uniquement dans les muscles squelettiques serait bénéfique car - comme montré dans notre étude publiée dans *Science advances* - suffisant pour provoquer un effet global de perte de masse ; de plus, cette régionalisation de la réponse permet d'éviter une réduction de couplage à l'échelle de l'organisme, et donc dans des organes vitaux comme le coeur ou le cerveau. Ainsi, un traitement systémique avec un AAV ciblant le muscle est envisageable chez nos individus sains, mais aussi chez des individus rendus préalablement obèses, ou bien encore dans des modèles génétiques d'obésité.

Ma contribution

J'ai mené l'ensemble des expérimentations nécessaires à la réalisation de cette partie de résultats.

CHAPITRE 3 : EXPLORATION DE LA CORRECTION DE LA MYOPATHIE LIEE A LA DELETION D'HACD1 PAR MODULATION GENETIQUE

Dans ce troisième chapitre, nous abordons une stratégie de sauvetage complémentaire à une potentielle thérapie génique pour le gène *Hacd1*. En effet, la thérapie génique constitue un traitement lourd à mettre en place, très personnalisé et qui demande une sécurité accrue quant aux nombreux risques d'effets secondaires, notamment avec l'utilisation des AAV. Dans ce contexte, l'idée émerge de la mise en place de traitements non pas adaptés à chaque mutation, mais plutôt par classe de phénotype : ainsi, par exemple, les myopathies similaires dans leur pathophysiologie pourraient être traitées de la même façon, même si l'atteinte génétique est différente. Ces traitements fonctionneraient sur une similarité de mécanismes physiologiques ou moléculaires, et non de mutations. Ainsi, nous présentons dans une première partie une tentative de correction de la myopathie liée à la délétion en *Hacd1* par modulation de *Dnm2*, gène essentiel à la dynamique des membranes, et potentiellement à la dynamique mitochondriale (Lee et al., 2016). Nous concluons par une approche *via* la réduction de l'expression de la tétraspanine Cd9, qui joue un rôle inhibiteur dans la fusion des myoblastes (Charrin et al., 2013; Jin et al., 2018).

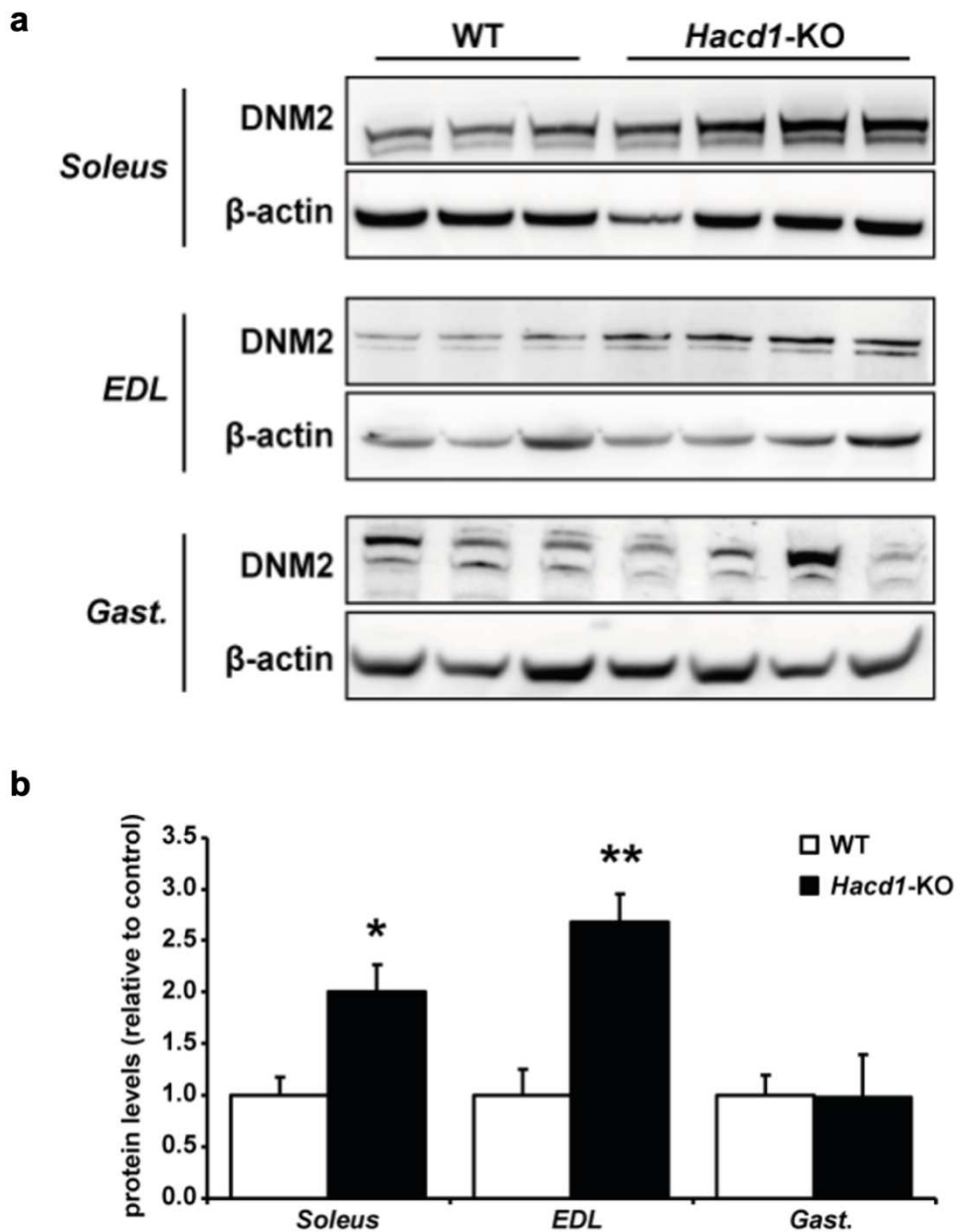


Figure 17 : Expression de la protéine DNM2 chez les individus WT et *Hacd1-KO*.

(a) Western blot de l'expression de DNM2 dans différents muscles de souris WT et *Hacd1-KO* adultes : le soleus, l'extensor digitorum longus (EDL) et le gastrocnémien.
 (b) Quantification du western blot.

RESULTATS 5 : EXPLORATION DE LA CORRECTION DE LA MYOPATHIE LIEE A *HACD1* PAR MODULATION DE L'EXPRESSION DU GENE *DNM2*

Problématique

Parmi les nombreuses stratégies envisagées dans le cadre des traitements de myopathies congénitales, l'idée de "panthérapies" permettant de traiter plusieurs maladies génétiquement différentes mais similaires en pathophysiologie émerge (Tasfaout et al., 2018). C'est ainsi que dans le cadre des myopathies centronucléaires, on retrouve dans plusieurs affections (dues à la perte de *Bin1* ou *Mtm1* par exemple) un sauvetage significatif du phénotype par la diminution de l'expression du gène *Dnm2*, suggérant que sa modulation puisse constituer un traitement pour plusieurs myopathies, grâce à un inhibiteur pharmacologique ou des oligonucléotides antisens. De plus, les mutations perte de fonction de *Mtm1* et de *Bin1* ainsi que le gain de fonction de *Dnm2* provoquent des myopathies proches de celle liée à la perte de fonction du gène *Hacd1*. C'est ainsi que nous avons voulu vérifier si la diminution de l'expression de *Dnm2* pouvait constituer une thérapie envisageable pour les individus myopathes suite à la délétion d'*Hacd1*. Nous avons pour cela collaboré avec le groupe de Jocelyn Laporte (Illkirch) et importé de chez eux une lignée *Dnm2^{KO/+}* disponible dans un fonds Pas129 (et non C57Bl/6N comme nos souris).

Résultats

Avant de tester si cette hypothèse de sauvetage était envisageable, nous avons noté que les souris *Hacd1*-KO présentent une augmentation de l'expression de DN2 dans certains muscles, tels que le soléaire et l'EDL (**fig. 17**). Ce point était un argument supplémentaire pour tester une modulation de l'expression de *Dnm2* chez les individus *Hacd1*-KO.

La délétion complète de *Dnm2* est létale mais l'hétérozygotie pour son allèle KO est suffisante pour corriger la myopathie liée à la perte de fonction de *Mtm1* ou de *Bin1* (refs). Nous avons donc réalisé un croisement en deux étapes entre hétérozygotes pour la délétion en *Hacd1* et pour *Dnm2* pour obtenir des individus WT (*Hacd1^{+/+}* ; *Dnm2^{+/+}*), *Hacd1*-KO (*Hacd1^{KO/KO}* ; *Dnm2^{+/+}*), hétérozygotes pour *Dnm2* (*Hacd1^{+/+}* ; *Dnm2^{KO/+}*) ou doubles mutants (*Hacd1^{KO/KO}* ; *Dnm2^{KO/+}*), dont le phénotype serait similaire à celui des individus WT dans le cas d'un sauvetage phénotypique par la délétion de *Dnm2*.

Concernant les femelles (**fig. 18-a**), nous n'avons observé aucune différence de masse corporelle entre les individus WT, *Hacd1*-KO et doubles mutants, alors que les individus hétérozygotes pour *Dnm2* semblaient avoir une masse légèrement plus élevée (**fig. 18-b**). Une tendance similaire était visible pour la masse cardiaque (**fig. 18-c**). Concernant les muscles, les masses du TA et du gastrocnémien étaient inférieures chez les *Hacd1*-KO et les doubles mutants par rapport aux WT et aux hétérozygotes *Dnm2* et n'étaient pas différentes entre elles

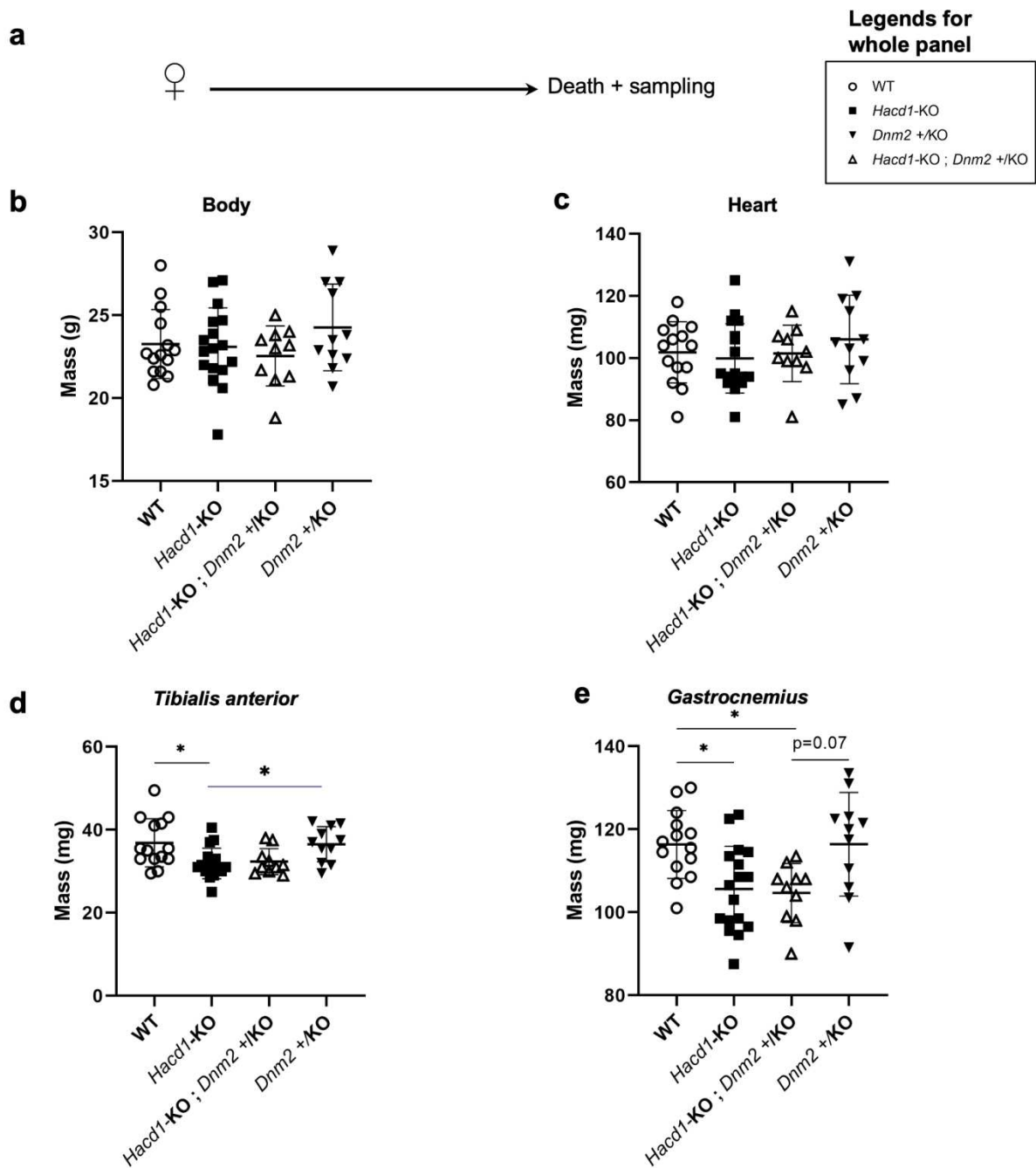


Figure 18 : Effets de la diminution de l'expression de *Dnm2* chez les femelles *Hacd1*-KO.

(a) Chronogramme des expériences sur les femelles pour tester le sauvetage de la myopathie due à la délétion d'*Hacd1*, par réduction de l'expression de *Dnm2*. (b-e) Masse corporelle (b), du cœur (c), du *tibialis anterior* (d) et du gastrocnémien (e) à l'âge adulte (12 mois).

-KO = -/-

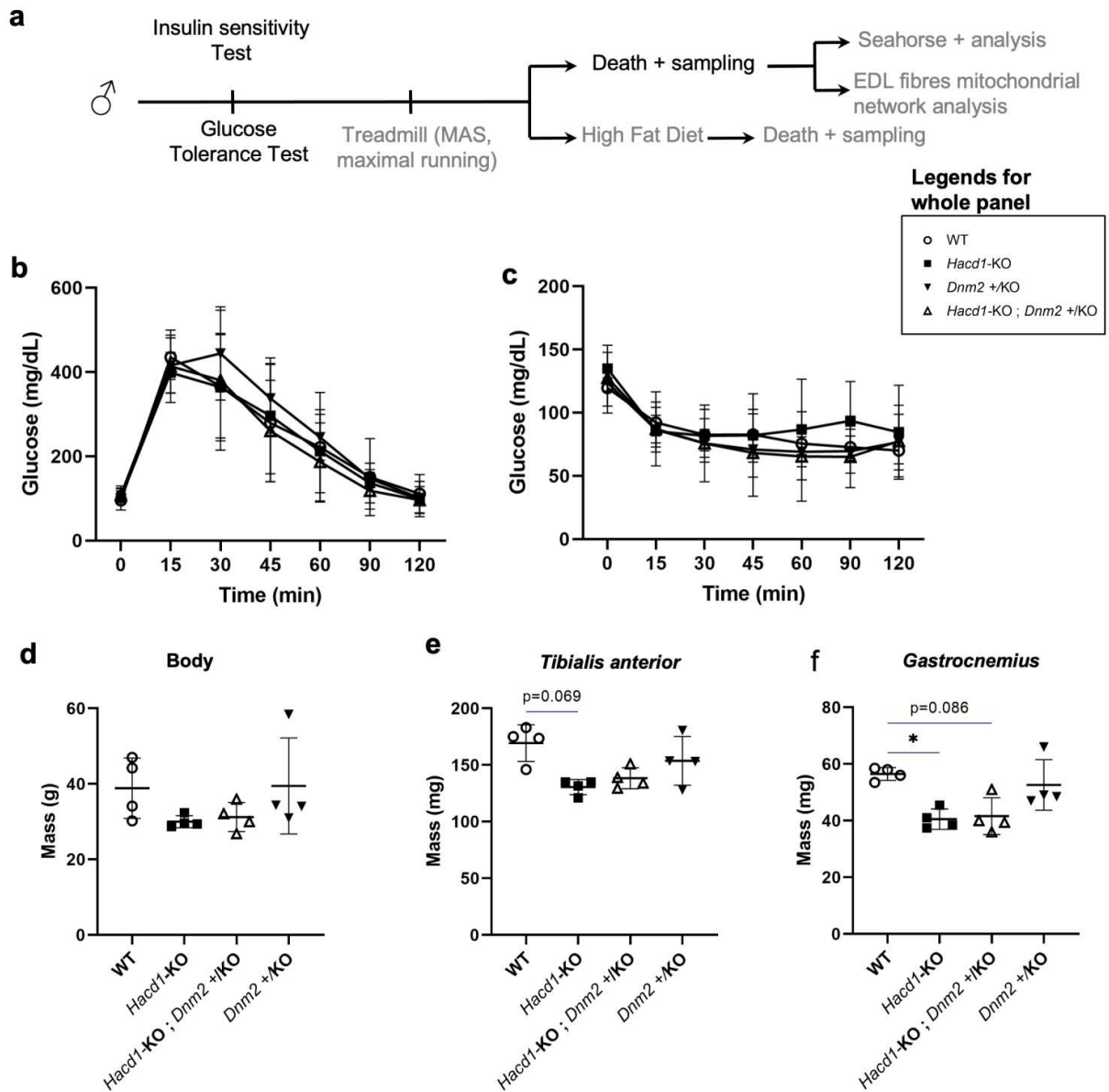


Figure 19 : Effets de la diminution de l'expression de *Dnm2* chez les mâles *Hacd1*-KO – Métabolisme du glucose et masse musculaire.

(a) Chronogramme des expériences sur les mâles pour tester le sauvetage de la myopathie due à la délétion d'*Hacd1*, par réduction de l'expression de *Dnm2*. (b-c) Test de tolérance au glucose (b) et de sensibilité à l'insuline (c). (d-f) Masse corporelle (d), du *tibialis anterior* (e) et du gastrocnémien (f) à l'âge adulte (12 mois).

-KO = -/-

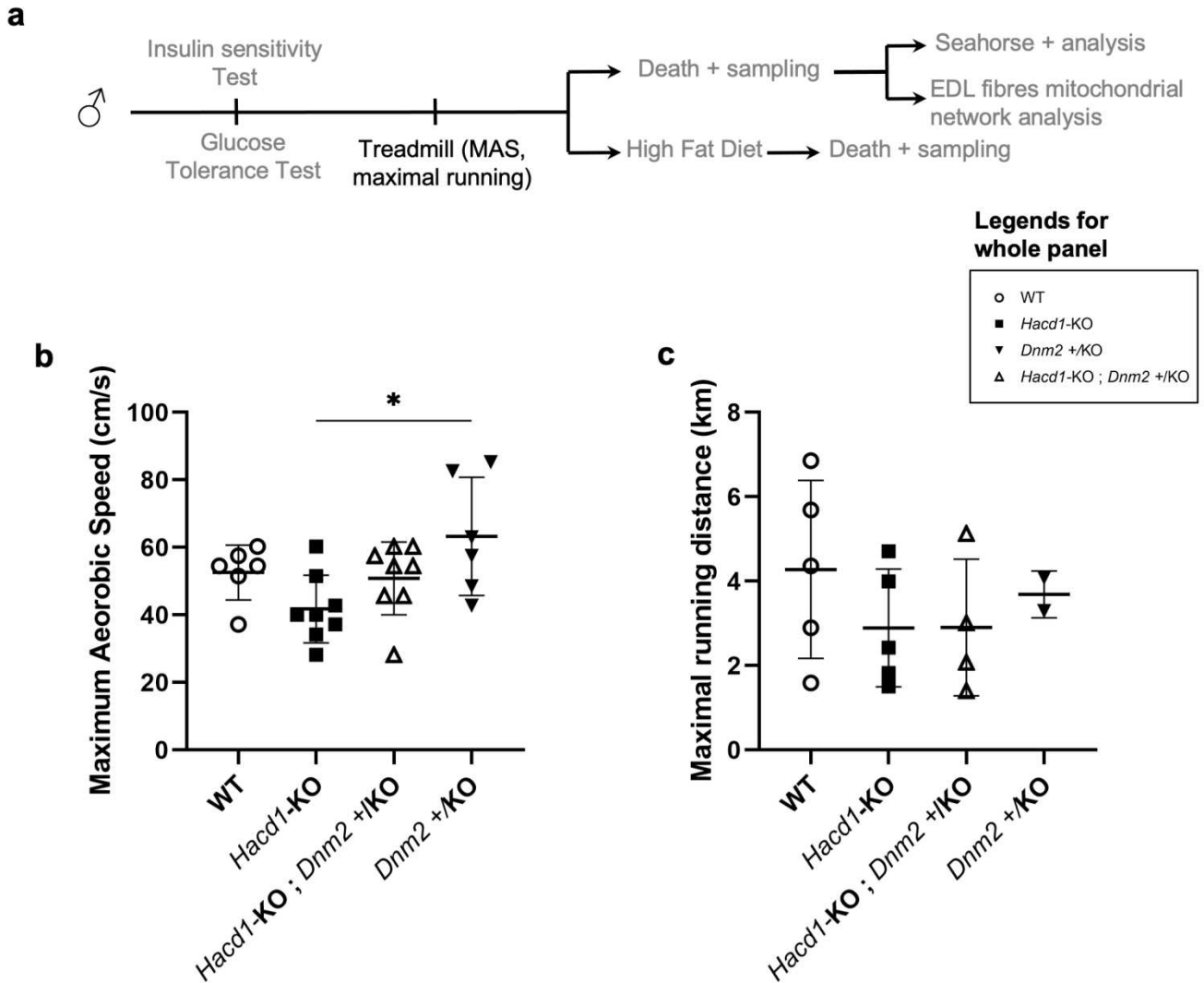


Figure 20 : Effets de la diminution de l'expression de *Dnm2* chez les mâles *Hacd1*-KO – Fonction musculaire.

(a) Chronogramme des expériences sur les mâles pour évaluer la fonction musculaire. (b-c) Evaluation sur tapis de course de la Vitesse Maximale Aérobie (b) et de la distance maximale parcourue à 60% de la VMA individuelle (c).

MAS = maximal aerobic speed.

-KO = -/-

(**fig. 18-d et 18-e**). Nous retrouvons donc bien la réduction de masse musculaire liée à la perte de fonction d'*Hacd1* et elle n'était pas corrigée par la réduction d'expression de *Dnm2*.

Concernant les mâles, nous avons pu évaluer les paramètres liés au fonctionnement musculaire, au métabolisme et à la respiration mitochondriale.

Pour observer les caractéristiques métaboliques (**fig. 19-a**), nous avons premièrement évalué dans les différents groupes la tolérance au glucose (**fig. 19-b**) et la sensibilité à l'insuline (**fig. 19-c**). Ces deux paramètres se trouvaient inchangés dans les différents groupes et nous n'avons donc pas retrouvé la hausse de tolérance au glucose et de sensibilité à l'insuline normalement observée chez les mâles *Hacd1*-KO. Concernant la masse des animaux (**fig. 19-d**) et de leurs muscles (**fig. 19-e et 19-f**), nous avons observé, comme pour les femelles, une réduction de la masse corporelle chez les individus *Hacd1*-KO et doubles mutants par rapport aux WT et aux hétérozygotes pour *Dnm2* (**fig. 19-d**), bien que non significative à cause du faible nombre d'individus par groupe et de leur variation de masse. Au niveau des masses musculaires, nous avons observé une réduction de la masse du TA chez les individus *Hacd1*-KO (**fig. 19-e**) ainsi qu'une forte tendance à la diminution du gastrocnémien par rapport aux WT (**fig. 19-f**). Les individus doubles mutants suivaient cette tendance, tandis que les souris hétérozygotes pour *Dnm2* présentaient une masse musculaire intermédiaire entre les *Hacd1*-KO et les WT. Il semblerait donc que si les mâles *Hacd1*-KO récapitulaient le phénotype attendu, les doubles mutants n'aient pas été sauvés au niveau de leur masse musculaire.

Nous avons voulu vérifier si cette absence de sauvetage au niveau de la masse musculaire s'accompagnait ou non d'une amélioration des capacités physiques des doubles mutants (**fig. 20-a**). Nous avons donc évalué leur vitesse maximale aérobie (VMA, **fig. 20-b**) et leur endurance (distance maximale parcourue à 60% de la VMA, **fig. 20-b**). Bien que non significative, nous retrouvons chez les individus *Hacd1*-KO une diminution de la VMA par rapport aux WT, alors que celle des doubles mutants était très proche de celle des WT. Les hétérozygotes pour *Dnm2* avaient une VMA supérieure aux WT (**fig. 20-b**). Au contraire, pour l'endurance, il semblerait - bien que ceci soit non significatif suite au manque d'individus sur l'étude - que les individus doubles mutants aient une valeur similaire à celle des *Hacd1*-KO, diminuée par rapport aux WT (**fig. 20-c**). Les hétérozygotes pour *Dnm2* avaient cette fois une valeur intermédiaire.

Nous avons enfin évalué la respiration mitochondriale (**fig. 21-a**), dans le TA (**fig. 21-b à 21-d**), muscle mixte du point de vue métabolique, et dans le gastrocnémien superficiel (**fig. 21-e à 21-g**), muscle principalement glycolytique. Aucune différence significative n'a pu être observée en raison du faible nombre d'échantillons et de la dispersion des valeurs. Nous nous contenterons donc d'évoquer les moyennes obtenues pour les différents paramètres. Dans les deux muscles, nous avons observé une respiration couplée et non couplée diminuée chez les *Hacd1*-KO par rapport aux WT, et de valeur similaire chez les doubles mutants. Quant aux hétérozygotes *Dnm2*, la respiration était identique à celle des WT dans le TA et augmentée dans le gastrocnémien. Le ratio entre ces deux valeurs, qui reflète le couplage mitochondrial, a donné lieu à des valeurs très similaires entre groupes (**fig. 21-d, 21-g**).

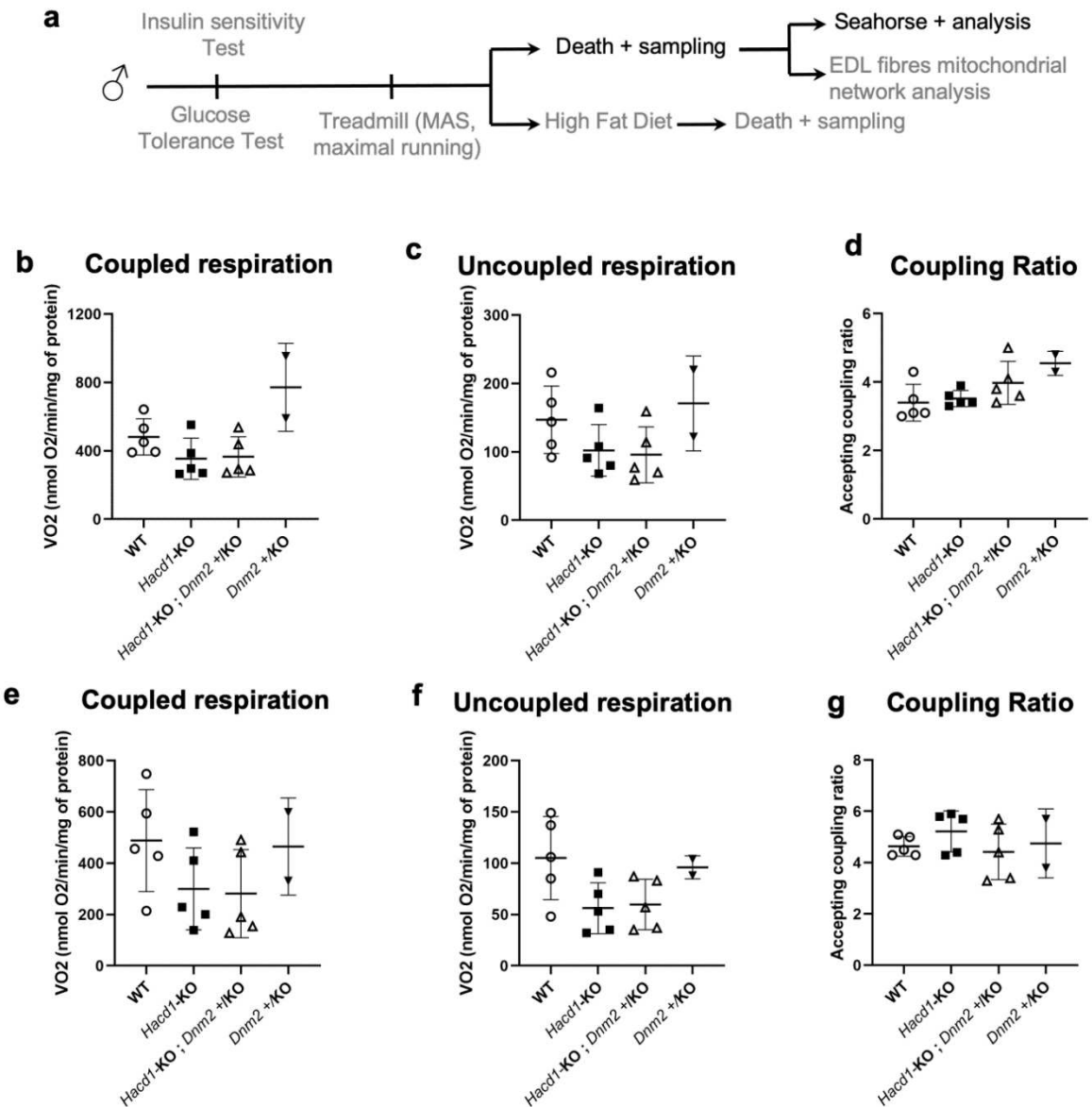


Figure 21 : Effets de la diminution de l'expression de *Dnm2* chez les mâles *Hacd1-KO* – Fonction mitochondriale.

(a) Chronogramme des expériences sur les mâles pour quantifier la respiration mitochondriale. (b-d) Evaluation sur extrait musculaire de *tibialis anterior* de la respiration mitochondriale couplée (b) et non couplée (c) et ratio de couplage mitochondrial correspondant (d). (e-g) Evaluation sur extrait musculaire de gastrocnémien superficiel de la respiration mitochondriale couplée (e) et non couplée (f) et ratio de couplage mitochondrial correspondant (g).

-KO = -/-

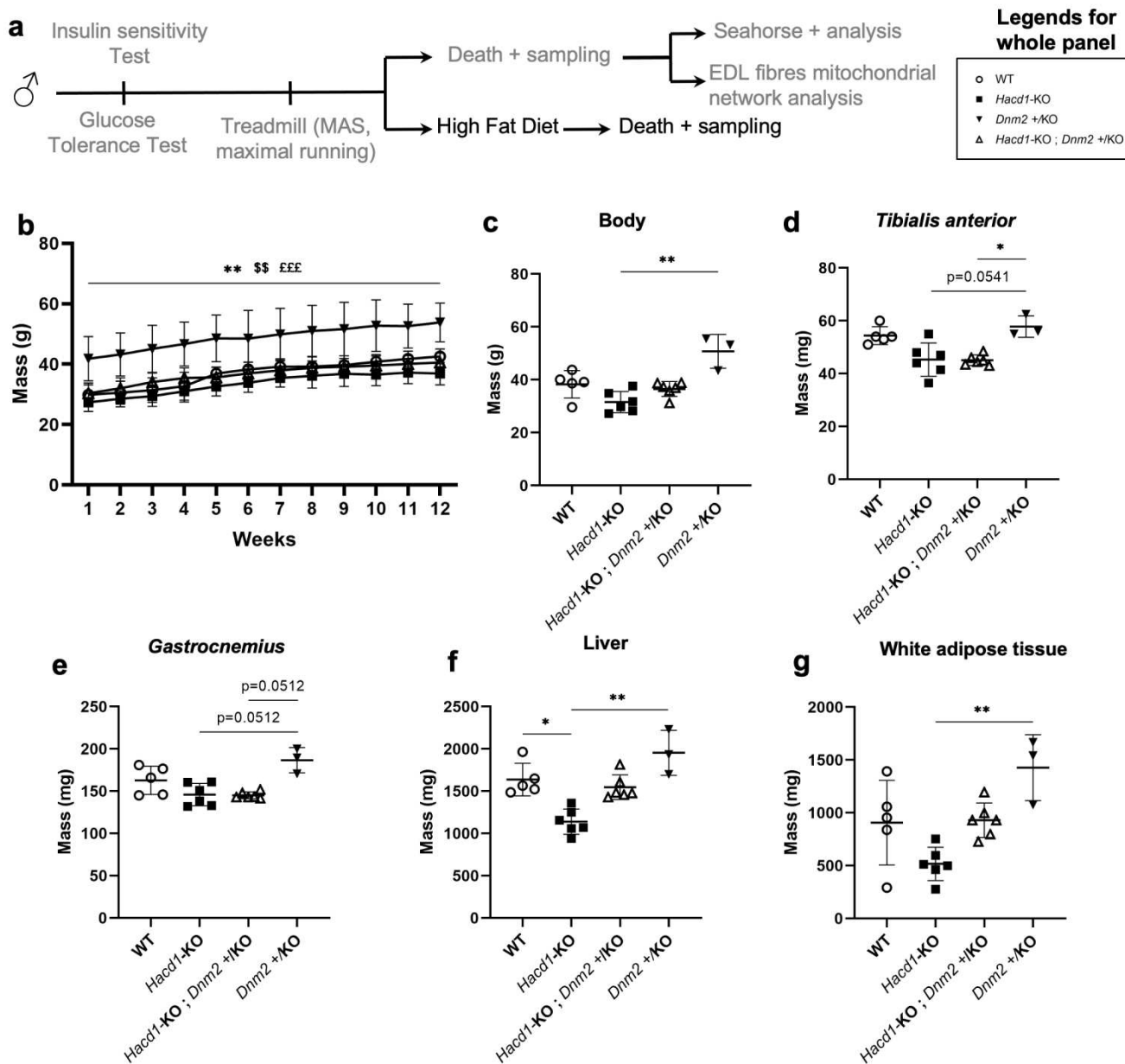


Figure 22 : Effets de la diminution de l'expression de *Dnm2* chez les mâles *Hacd1*-KO – Métabolisme énergétique lors d'un régime riche en graisse.

(a) Chronogramme des expériences sur les mâles pour tester la protection contre l'obésité dans le contexte de la délétion d'*Hacd1* et d'une réduction de l'expression de *Dnm2*. (b) Masse des individus au cours des semaines en *High Fat Diet* (HFD). (c-g) Masse corporelle (c), masse du *tibialis anterior* (d), du gastrocnémien (e), du foie (f) et du tissu adipeux blanc (g) à la fin des 12 semaines d'HFD.

-KO = -/-

* En comparaison aux WT, \$ aux *Hacd1*-KO ; *Dnm2* +/KO, £ aux *Hacd1*-KO

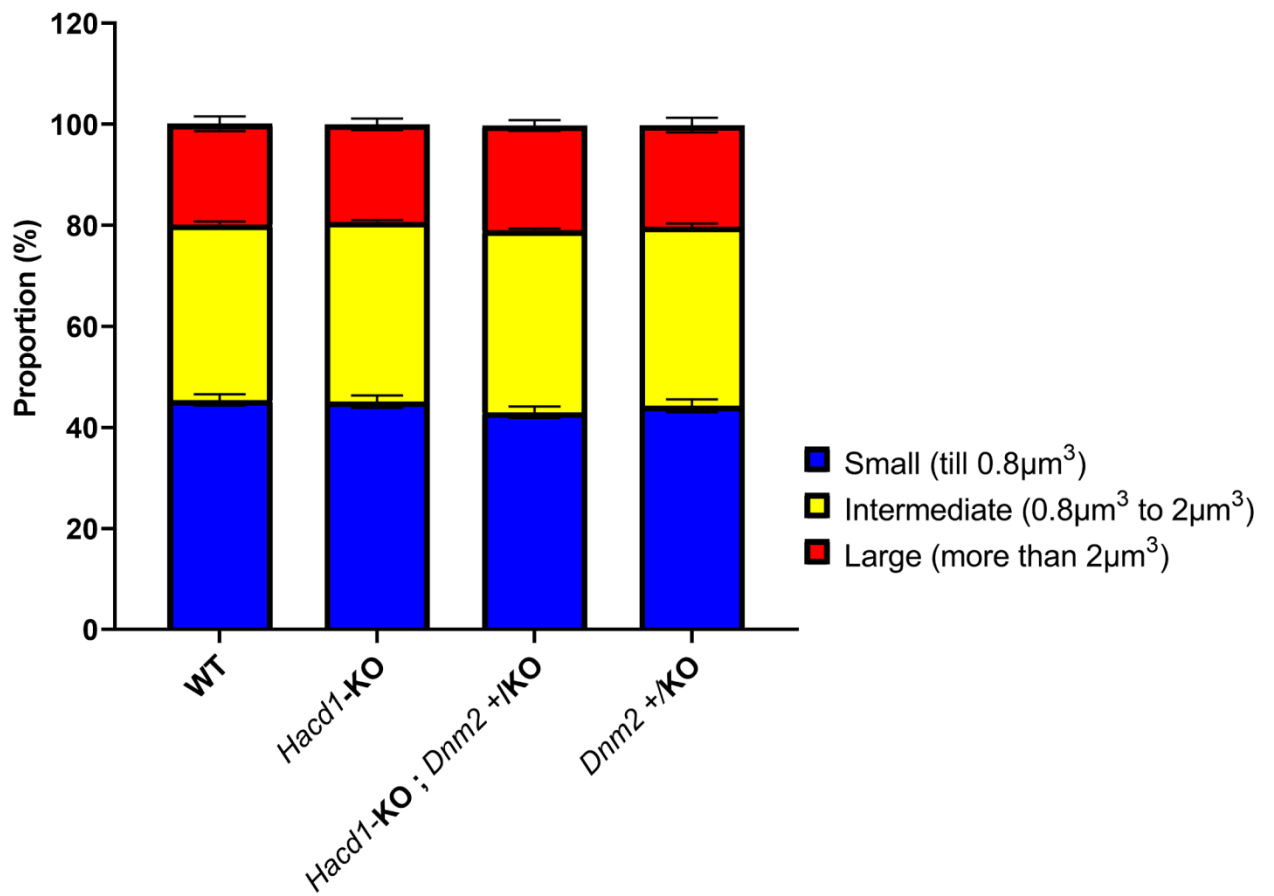


Figure 23 : Morphologie du réseau mitochondrial chez les souris *Hacd1*-KO hétérozygotes pour *Dnm2*.

Histogramme de la morphologie mitochondriale dans des fibres isolées manuellement de différents individus mâles modulés pour l'expression de *Dnm2*.

n = 3 par groupe, avec pour chaque individus 3 fibres complètes analysées

-KO = -/-

Le fait de ne pas avoir retrouvé dans ce contexte génétique le défaut de couplage mitochondrial normalement observé chez les *Hacd1*-KO était de mauvais augure pour retrouver la protection contre l'obésité qui en découle normalement. De fait, lorsque nous avons soumis des individus de ces différents groupes à 12 semaines de HFD (**fig. 22-a**), l'évolution de la masse corporelle (**fig. 22-b**) a montré une tendance identique, avec des courbes parallèles entre les groupes ; cependant, si les individus WT, *Hacd1*-KO et doubles mutants se regroupaient, les individus hétérozygotes pour *Dnm2* étaient significativement plus lourds que les autres groupes. Au moment de l'euthanasie, nous avons observé une masse corporelle significativement inférieure chez les *Hacd1*-KO par rapport aux hétérozygotes *Dnm2* (**fig. 22-c**), de même que pour le TA et le gastrocnémien (**fig. 22-d, e**). Le gastrocnémien était également réduit chez les doubles mutants par rapport aux hétérozygotes *Dnm2*. Pour le foie (**fig. 22-f**) et le tissu adipeux blanc (**fig. 22-g**), les souris *Hacd1*-KO avaient une masse inférieure aux hétérozygotes *Dnm2* tandis que les WT et les doubles mutants avaient des valeurs intermédiaires. Toutes ces observations amènent à conclure que comme pour la respiration mitochondriale, nous n'avons pas pu retrouver le phénotype de protection contre l'obésité chez les *Hacd1*-KO dans ce contexte génétique, ce qui ne nous a pas permis de conclure quant à une correction par la mutation *Dnm2*.

Enfin, DNM2 serait impliquée dans la dynamique mitochondriale en tant que dernier intervenant de la fission (Lee et al., 2016). Dans le cas d'une fragmentation du réseau due à une surfission, la réduction de DNM2 pourrait rétablir la morphologie normale du réseau. Dans le cadre de cette étude, nous avons observé la morphologie du réseau mitochondrial des individus des différents groupes. Après prélèvement et fixation des myofibres d'EDL, nous avons réalisé une immunofluorescence en utilisant un anticorps anti-TOM20. Après acquisition d'images sur le volume total de la fibre, le signal et les volumes mitochondriaux ont été analysés et représentés par groupe de taille (**fig. 23**). Les quatre groupes présentaient une répartition identique de taille de mitochondries, y compris les souris *Hacd1*-KO ; l'absence de phénotype chez les souris *Hacd1*-KO confirme les résultats observés dans l'ensemble de l'étude, et est en faveur d'un problème de fonds génétique.

Conclusion et discussion

Dans cette partie, nous avons voulu vérifier si l'inactivation partielle du gène *Dnm2* chez des individus *Hacd1*-KO pouvait améliorer voire sauver la myopathie, c'est-à-dire normaliser les valeurs des doubles mutants à celles des WT. Cette étude était d'autant plus intéressante que *Dnm2* est un gène essentiel à la bonne formation et maintien des tubules T, dilatés chez les chiens mutants pour *HACD1* (Walmsley et al., 2017), mais aussi car l'expression de DNM2 est augmentée chez les souris *Hacd1*-KO. Cette étude semblait donc prometteuse.

Suite à la mise en place du lot expérimental, nous avons évalué les caractéristiques musculaires et locomotrices ainsi que le phénotype métabolique des individus double mutants par rapport aux autres groupes, et notamment aux WT. Même si nos effectifs se sont avérés

trop faibles, les souris *Hacd1*-KO semblaient bien présenter une masse musculaire réduite, comme attendu de leur défaut de fusion lors du développement musculaire (Blondelle et al., 2015) et les doubles mutants partageaient ce phénotype, laissant supposer que les défauts de fusion des myoblastes étaient toujours présents malgré la réduction d'expression de *Dnm2*.

En étude fonctionnelle, les faibles effectifs et la dispersion des valeurs ne permettent pas de statuer définitivement quant au phénotype des différents groupes. On peut signaler que les individus doubles mutants avaient une VMA améliorée par rapport aux *Hacd1*-KO, mais une endurance aussi faible. La VMA reflète l'épuisement du glucose et la production du lactate par la voie anaérobie préférentiellement, alors que la distance maximale avant épuisement est plutôt liée à un métabolisme aérobie avec oxydation des acides gras dans la mitochondrie. Les individus doubles mutants auraient peut-être un métabolisme du glucose normal. Nous devons cependant rester très prudents dans cette interprétation.

Concernant le métabolisme énergétique, nous n'avons pas pu retrouver les altérations attendues chez les animaux *Hacd1*-KO, à savoir une hausse de la tolérance au glucose et de la sensibilité à l'insuline, une baisse du couplage mitochondrial et une protection contre l'obésité. Il nous est donc impossible de conclure quant à un sauvetage par la réduction de l'expression de *Dnm2*. Notons que lors du HFD, les animaux hétérozygotes pour *Dnm2* ont pris significativement plus de poids que les autres groupes.

Enfin, DNМ2 serait impliquée dans la dynamique mitochondriale et son expression étant augmentée chez les individus *Hacd1*-KO de notre lignée usuelle, sa modulation pourrait permettre de sauver la fragmentation observée. Cependant, nous n'avons pas retrouvé de fragmentation chez les individus *Hacd1*-KO dans ce contexte génétique. Nous ne pouvons là encore pas conclure sur l'effet d'une diminution de l'expression de *Dnm2* sur la fragmentation mitochondriale.

En résumé, il semblerait que nous n'observions pas d'effet de la réduction d'expression de *Dnm2* sur l'hypotrophie musculaire due à la mutation d'*Hacd1* et que nous ne puissions rien conclure sur le versant métabolique, par absence de reproduction du phénotype lié à la mutation d'*Hacd1* dans ce contexte. Comment expliquer cela alors qu'il s'agit d'observations pourtant répétées au sein de plusieurs lots précédents avec une grande robustesse ? Nous avons rencontré dans cette étude deux limitations majeures, la première étant le faible nombre d'animaux alloué à chaque partie d'expérience, ce qui a entraîné une trop faible puissance statistique. Nous avons ainsi bien souvent dû extrapoler les résultats, qui se devraient d'être confirmés sur des groupes plus grands. La seconde limitation majeure, évidente sur chaque figure, était l'hétérogénéité phénotypique des souris hétérozygotes pour *Dnm2*. En effet, celles-ci étaient bien souvent au-dessus de toutes les autres valeurs, quel que soit le groupe considéré. Il semblerait que ce problème soit dû à un fonds génétique trop hétérogène. En effet, les individus hétérozygotes pour *Dnm2* provenaient d'un fonds 129PAS, alors que nos souris étaient dans un fond C57Bl/6N. Le fonds C57Bl/6N est considéré comme un fonds de référence pour les études de métabolisme, en particulier car ces souris restent assez fines avec l'âge, contrairement aux souris agouti (telles que les 129PAS), qui prennent beaucoup plus de

poids. Nous avons de fait remarqué, suite aux croisements, que le phénotype agouti apporté par les animaux hétérozygotes pour *Dnm2* de départ coïncidait quasi-systématiquement avec des valeurs plus élevées que la moyenne de son groupe, que ce soit pour les masses ou les valeurs d'activité locomotrice- ce qui a aussi contribué à de fortes variations et donc une perte de puissance statistique. Enfin, cette hétérogénéité nous a aussi amené à découvrir un phénotype lié aux études de locomotion forcée, bien que nous ayons réalisé avant cela de nombreux tests de locomotion avec succès. En effet, les individus agouti se blessaient régulièrement au niveau des griffes lors des entraînements de course, ce qui nous a amené à devoir couper les griffes des individus non blessés avant les exercices, et à retirer les individus blessés du lot de course (ce qui a participé encore à la réduction de notre puissance statistique). Enfin, cette hétérogénéité nous a aussi poussés à revoir notre programme d'évaluation de la VMA, les individus agouti ayant des valeurs plus élevées que les individus noirs.

En conclusion, il serait intéressant de reproduire cette étude en évitant ce phénomène d'hétérogénéité, comme par exemple en générant des hétérozygotes pour *Dnm2* dans un fonds C57Bl/6N. Enfin, une approche différente serait d'injecter des oligonucléotides antisens ciblant *Dnm2* afin de réduire son expression dans notre modèle dans son fonds habituel. Nous pourrions ainsi réduire le nombre d'individus et éviter les problèmes d'hétérogénéité génétique. L'intérêt majeur de cette approche est aussi qu'elle peut être directement transposable dans le cadre d'un traitement.

Ma contribution

J'ai mené l'ensemble des expérimentations nécessaires à la réalisation de cette partie de résultats.

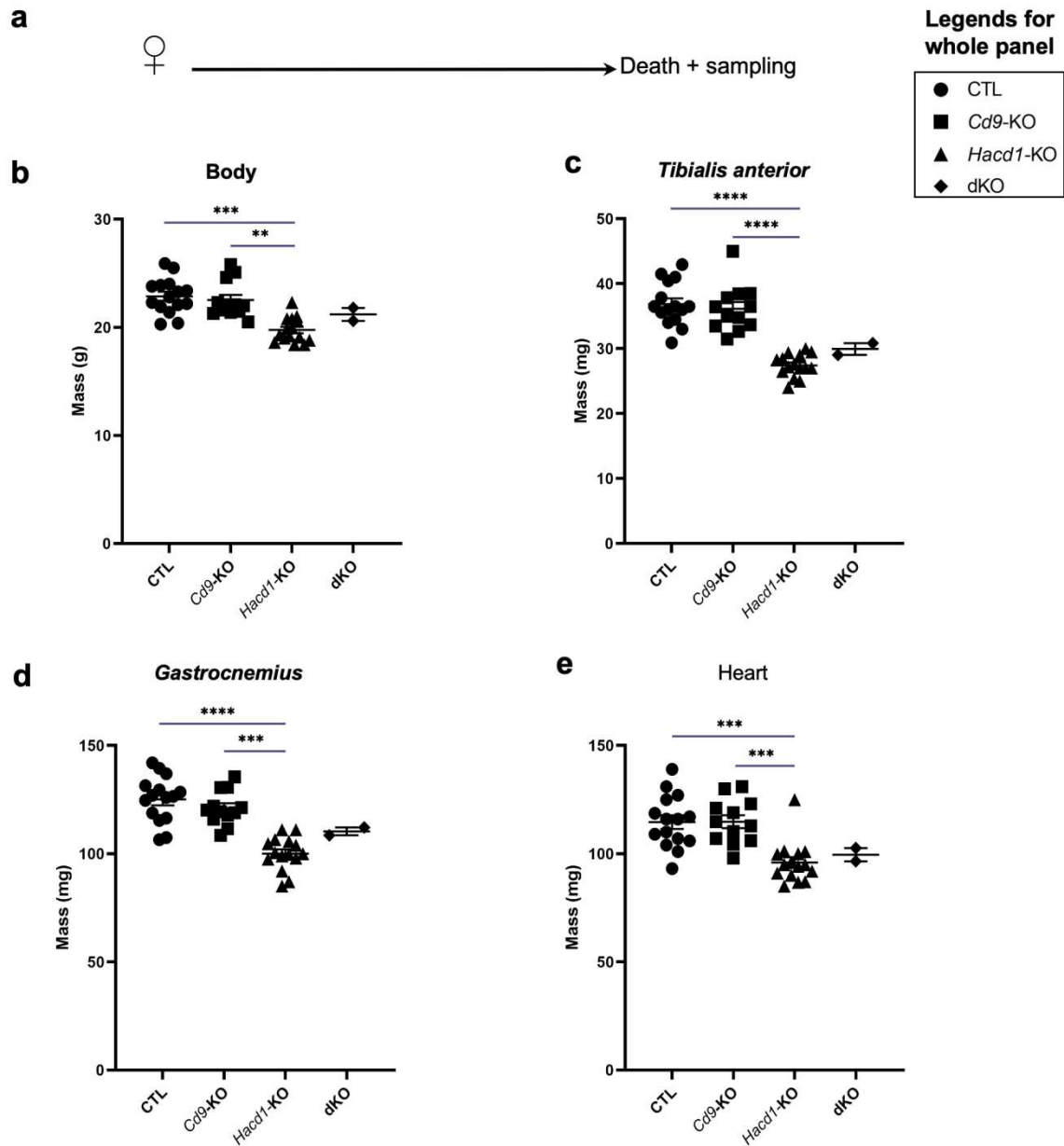


Figure 24 : Test du sauvetage de la myopathie due à la délétion d'*Hacd1* par délétion de *Cd9* chez les femelles.

(a) Chronogramme des expériences sur les femelles pour tester le sauvetage de la myopathie due à la délétion d'*Hacd1*, par délétion de *Cd9*. (b-e) Masse corporelle (b), masse du *tibialis anterior* (c), du gastrocnémien (d) et du cœur (e).

CTL = WT, -KO = -/-, dKO = double KO

RESULTATS 6 : EXPLORATION DE LA CORRECTION DE L'HYPOTROPHIE MUSCULAIRE LIEE A LA DELETION D'*HACD1* PAR LA MUTATION DE *CD9*

Problématique

Notre laboratoire a mis en évidence que la myopathie due à la perte de fonction du gène *Hacd1* est notamment due à une hypotrophie des fibres musculaires (Blondelle et al., 2015). Il est donc envisageable de chercher à améliorer la fonction musculaire chez les individus atteints en rétablissant au moins partiellement le diamètre des fibres musculaires, et donc une masse musculaire suffisante chez ces individus. Pour cela, plusieurs stratégies sont possibles : augmenter des conditions favorisant la fusion, ou diminuer une activité inhibitrice. C'est cette deuxième option que nous avons décidé d'appliquer ici, en diminuant l'expression d'une protéine de la famille des tétraspanines, CD9, car il a été montré que l'inhibition des tétraspanines CD9 et CD81 provoque un excès de fusion des myoblastes lors du développement musculaire chez la souris (Charrin et al., 2013). Nous avons donc voulu évaluer les capacités fonctionnelles et morphologiques des individus *Hacd1*-KO dont l'expression de *Cd9* était diminuée.

Résultats

Pour étudier l'impact de la diminution de l'expression de *Cd9* sur les individus *Hacd1*-KO, et notamment sur le phénotype myopathique, nous avons obtenu de l'équipe d'Eric Rubinstein (IGR, Villejuif) des animaux *Cd9*-KO et généré un groupe d'étude par croisement entre double hétérozygotes afin d'obtenir des individus WT (*Hacd1*^{+/+} ; *Cd9*^{+/+}), des individus *Cd9*-KO *Hacd1*^{+/+} ; *Cd9*^{KO/KO}), des individus *Hacd1*-KO (*Hacd1*^{KO/KO} ; *Cd9*^{+/+}) et enfin des individus doubles KO (*Hacd1*^{KO/KO} ; *Cd9*^{KO/KO}). Nous avons ainsi pu évaluer leurs capacités physiques sur tapis roulant puis leur masse corporelle et musculaire.

Chez les femelles, seules les masses ont été évaluées (**fig. 24-a**). Ainsi, nous notons que les souris *Hacd1*-KO présentaient une réduction de la masse corporelle par rapport aux WT (**fig. 24-b**), bien que le groupe double KO ne possèdent que deux individus. Les souris *Cd9*-KO possédaient une masse similaire à celle des WT. Enfin, les individus doubles KO n'étaient qu'au nombre de deux et présentaient une valeur intermédiaire (**fig. 24-b**). Ces mêmes observations étaient visibles sur la masse du TA (**fig. 24-c**), du gastrocnémien (**fig. 24-d**) ainsi que, de manière plus surprenante, du coeur (**fig. 24-e**).

Concernant les mâles (**figure 25-a**), la masse corporelle (**fig. 25-b**), la masse du TA (**fig. 25-c**) ainsi que la masse du gastrocnémien (**fig. 25-d**) étaient bien réduites chez les individus *Hacd1*-KO par rapport aux WT et aux *Cd9*-KO, récapitulant le phénotype myopathique observé précédemment. Quant aux individus doubles KO, ils présentaient des valeurs similaires aux *Hacd1*-KO.

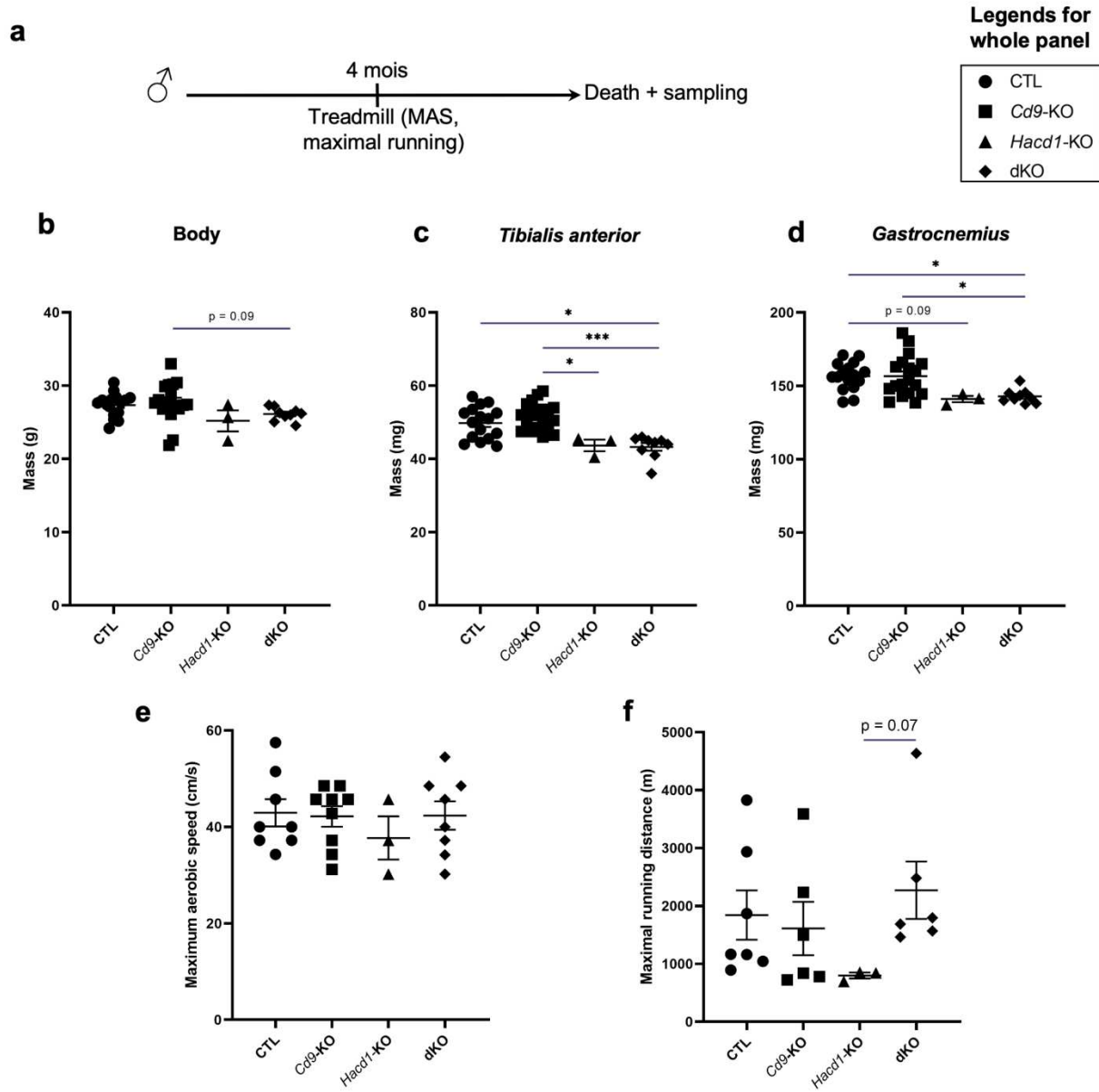


Figure 25 : Test du sauvetage de la myopathie due à la délétion d'*Hacd1* par délétion de *Cd9* chez les individus mâles.

(a) Chronogramme des expériences sur les mâles pour tester le sauvetage de la myopathie due à la délétion d'*Hacd1*, par délétion de *Cd9*. (b-d) Masse corporelle (b), masse du *tibialis anterior* (c) et du gastrocnémien (d). (e) Vitesse Maximale Aérobie (VMA). (f) Distance maximale parcourue à 60% de la VMA individuelle.

CTL = WT, -KO = -/-, dKO = double KO

Vu que les individus *Cd9*-KO ne présentaient pas de masse corporelle ni musculaire supérieure aux WT, peut-être que l'augmentation du diamètre des fibres n'était pas suffisante pour voir une augmentation de masse, mais qu'elle l'était déjà assez pour voir une amélioration des capacités physiques. Nous avons donc évalué dans chacun des groupes la VMA (**fig. 25-e**) et la distance maximale parcourue à 60% de la VMA (**fig. 25-f**). Bien que les effectifs n'aient pas permis d'obtenir une significativité sur la VMA, celle-ci avait tendance à être réduite chez les individus *Hacd1*-KO, alors qu'elle était normale chez les *Cd9*-KO ainsi que chez les doubles KO (**fig. 25-e**). Nous avons observé le même profil pour la distance maximale (**fig. 25-f**). Ainsi, il semblerait que les individus doubles KO aient pu être corrigés pour l'aspect fonctionnel de la myopathie.

Conclusion - discussion

Cette étude a cherché à mettre en évidence si la délétion du gène *Cd9*, dont le rôle est normalement d'inhiber la fusion des myoblastes lors du développement musculaire (Charrin et al., 2013), pouvait permettre de rétablir tout ou partie de la fonction musculaire chez les individus *Hacd1*-KO. Que ce soit chez les individus femelles ou mâles, nous n'avons pas observé chez les individus doubles KO d'amélioration de la masse musculaire ou corporelle. Cependant, nous avons observé chez les mâles que leur fonction musculaire lors d'un exercice semblait rétablie suite à cette modulation de *Cd9*. Cet effet est intéressant puisqu'une amélioration des capacités physiques serait le but visé par un traitement. Cependant, cette étude met en évidence que le lien entre diamètre des fibres et capacités musculaires n'est pas forcément évident. Nous projetons de réaliser des coupes sur les muscles prélevés et congelés afin de vérifier si les diamètres des fibres étaient bien augmentés, et si cela était homogène ou ne touchait qu'un type de fibres. Ceci pourrait nous amener à mettre en évidence un autre rôle sur la fonction musculaire des tétraspanines, qui expliquerait éventuellement une augmentation des capacités physiques malgré l'absence de gain de masse. Enfin, il existe un grand nombre de membres dans la famille des tétraspanines, notamment *Cd81*, qui est connu pour inhiber la fusion des myoblastes en parallèle de *Cd9* (Charrin et al., 2013; Jin et al., 2018)). Il serait donc intéressant d'envisager un traitement sous forme de cocktail de tétraspanines modulées pour augmenter les effets visibles sur la masse musculaire.

Ma contribution

J'ai mené l'ensemble des expérimentations nécessaires à la réalisation de cette partie de résultats.

DISCUSSION

LES GENES HACD SONT ESSENTIELS POUR LA PHYSIOLOGIE MITOCHONDRIALE, DU DEVELOPPEMENT AU FONCTIONNEMENT MUSCULAIRE

Le gène *Hacd1* a été découvert car sa perte de fonction provoque une myopathie centronucléaire chez le Labrador retriever (Blondelle et al., 2015). Nous avons mis en évidence d'une part que l'isoforme active d'*Hacd1* est quasi-exclusivement exprimée dans les muscles striés, et d'autre part qu'il existe une expression des autres gènes *Hacd* le muscle squelettique. Parmi les quatre gènes *Hacd*, *Hacd2* a une expression ubiquitaire et assez forte dans le muscle squelettique et *HACD1* et *HACD2* possèdent une forte similitude de séquences entre elles et sont les deux seules à pouvoir sauver la perte de fonction de leur homologue *Phs1* en levure (Ikeda et al., 2008).

Ces éléments laissaient supposer que le gène *Hacd2* puisse jouer un rôle important chez les mammifères et possiblement dans le muscle. Nous avons donc décidé de caractériser le rôle d'*Hacd2*, d'autant qu'aucune mutatin de ce gène n'a été déclarée à ce jour. Lors de la génération du modèle *Hacd2*-KO murin, nous avons remarqué l'absence de souriceaux homozygotes mutants ; après investigation, nous avons compris que l'absence de ce gène provoque une mortalité embryonnaire au stade E9.5 avec de profondes malformations cardiovasculaires. Nous avons pu observer chez ces embryons un dysfonctionnement mitochondrial global, associé à des anomalies importantes de la structure des crêtes mitochondriales (Khadhraoui *et al.*, en préparation) Un *Knock-Down* (KD) du gène *Hacd2* permet aux petits de naître et de vivre jusqu'à 1 à 4 semaines, stade où ils meurent suite à une atteinte systémique avec notamment un dysfonctionnement mitochondrial au niveau des reins et du foie.

Ainsi, *Hacd2* a prouvé être un gène essentiel dans le développement embryonnaire puis post-natal via un rôle clé dans la structure et la fonction mitochondriale. La perte de fonction d'*Hacd2* constitue donc un nouveau modèle de syndrome mitochondrial multi-organes, qui plus est par un mécanisme original *via* le cycle d'élongation des AGTLC qui n'avait pas été relié au fonctionnement mitochondrial au cours du développement jusque-là.

Notre travail sur *Hacd1*, qui a précédé et guidé celui sur *Hacd2*, avait préalablement révélé le rôle d'*Hacd1* dans la structure et le fonctionnement des mitochondries dans muscle squelettique (Prola et al., 2021). Les souris *Hacd1*-KO présentent une réduction de leur masse

musculaire et de leur locomotion spontanée et forcée. En parallèle, elles ont une moindre production d'ATP associée à une réduction du couplage mitochondrial, spécifique du muscle squelettique, ce qui amène à une augmentation du métabolisme basal capable de conférer une protection contre l'obésité induite par un régime riche en graisse. Le modèle *Hacd1*-KO démontre donc que l'on peut influencer le métabolisme global par découplage exclusivement musculaire.

Nous avons observé une forte diminution des phospholipides mitochondriaux, la cardiolipine (CL) étant la plus affectée. Cela pourrait expliquer le défaut de respiration, notamment par une modification des propriétés membranaires des mitochondries. En particulier, on retrouve la CL majoritairement dans la membrane interne mitochondriale (IMM) où elle exerce les rôles pléiotropes d'imperméabilisant, de maintien de la morphologie des crêtes mitochondriales et de stabilisation des supercomplexes (Lu and Claypool, 2015). Ainsi, notre modèle constitue le premier exemple de déficience en CL spécifique du muscle par la perte d'une enzyme de la voie de synthèse des AGTLC – et non pas directement de la voie de synthèse de la CL, comme reporté jusque-là. Sa diminution est un déterminant majeur du phénotype respiratoire observé, puisqu'un enrichissement en CL de mitochondries isolées est capable de restaurer un couplage mitochondrial normal.

Nous avons donc ici une preuve supplémentaire du rôle des CL dans la fonction mitochondriale et nous montrons que son niveau est contrôlé par le gène *Hacd1* dans le muscle squelettique. D'autre part, nous montrons qu'induire une diminution du couplage mitochondrial spécifiquement dans le muscle peut suffire à provoquer une élévation du métabolisme basal, ce qui pourrait constituer une méthode de traitement pour les syndromes métaboliques.

Dans l'optique de corriger la myopathie liée à la perte de fonction d'*Hacd1*, nous testerons prochainement un traitement de stabilisation des CL, à l'aide de la molécule Elamiprétide (aussi appelée MTP-131, Bendavia ou SS-31). C'est un membre des peptides Szeto-Schiller, qui sont des composés ciblant la mitochondrie (Birk et al., 2013). Celui-ci a la particularité de passer spontanément la membrane plasmique de nombreux types cellulaires, dont les myotubes. Les CL sont essentielles au fonctionnement mitochondrial, entre autres car elles permettent une courbure membranaire négative qui rapprochent les complexes de la chaîne respiratoire entre eux. La CL permet aussi l'attachement du cytochrome c par des interactions électrostatiques ; toutefois, dans 10-15% des cas, cette interaction est renforcée et la CL et le cytochrome c se retrouvent fortement liés entre eux : l'activité peroxydase du cytochrome c peut agir sur la CL. Or une oxydation des CL peut bloquer ces courbures et réduire l'efficacité de la chaîne respiratoire ; l'élamiprétide, en modifiant la structure des CL par sa liaison, empêche cette oxydation, stabilise les CL et maintient ainsi la fonction mitochondriale, qui plus est en favorisant le cytochrome c dans son rôle de transporteur d'électrons (Birk et al., 2014; Szeto and Birk, 2014). Nous avons donc ici une piste thérapeutique intéressante dans le

cadre de la perte de fonction d'*Hacd1*, puisqu'une stabilisation des CL pourrait permettre de restaurer l'activité respiratoire, d'autant que cette stratégie a fait l'objet d'une étude en phase I/II dans le cadre de myopathies mitochondriales, dont les caractéristiques sont relativement similaires à la délétion d'*Hacd1* – notamment au niveau musculaire, avec une intolérance à l'exercice et une perte d'efficacité respiratoire (Karaa et al., 2018). L'élamiprétide a permis dans cette étude l'amélioration de la distance à un test de marche (*6-minute walk test*) dès cinq jours après le début du traitement. Cette étude a débouché sur une seconde phase tout aussi concluante (Karaa et al., 2020). Ces preuves supplémentaires nous ont amené à établir un plan expérimental afin de tester l'élamiprétide sur les souris *Hacd1*-KO et de vérifier la respiration ainsi que les capacités physiques des souris suite au traitement.

LE GENE HACD1 EST UN REGULATEUR DE LA COMPOSITION DES MEMBRANES MITOCHONDRIALES ET DE LA MORPHOLOGIE DU RESEAU MITOCHONDRIAL

A la suite de ce projet, nous avons mis en évidence que le réseau mitochondrial était fragmenté dans les fibres musculaires des souris *Hacd1*-KO. Cet effet ne semble pas visible en myoblastes ni en myotubes *in vitro* (*data à confirmer avec l'acquisition d'individus supplémentaires*). Ceci suggérerait que la fragmentation apparaît dans des stades plus tardifs du développement, lors de la maturation des myotubes en myofibres (avec la mise en place de l'appareil contractile mature) ou bien suite au début de la locomotion des individus, provoquant une augmentation de la masse mitochondriale (et donc une production de lipides membranaires, notamment de CL, dépendant entre autre d'une élongation par *Hacd1*).

Il nous faudra maintenant préciser le type de fibres plus précisément affecté par cette fragmentation. En effet, il a été montré que les fibres de type I (oxydatives) ont tendance à avoir plutôt un réseau allongé, et les fibres de type II un réseau plus fragmenté comparativement (Mishra et al., 2015). Ayant observé une fragmentation chez les individus *Hacd1*-KO, nous pouvons affirmer que l'effet est réel et fort. Cependant, la dissociation des fibres pour cette expérience a été chimique, à base de collagénase ; outre le fait que le traitement est long – et donc que les fibres attendent longtemps avant imagerie –, il est aussi fragilisant pour les fibres – qui semblent plus perméables aux sondes comme le mitotracker. Surtout, certaines fibres se contractent spontanément sous l'effet du traitement et deviennent inutilisables pour l'imagerie. C'est pour cela que nous avons par la suite mis au point une dissociation manuelle des fibres par dilacération, permettant ainsi de garder l'intégrité des fibres et d'aller plus rapidement en imagerie. Nous pourrions donc reproduire l'expérience en utilisant cette technique pour définitivement valider notre phénotype, et pouvoir prendre en

compte la typologie des fibres en couplant une immunofluorescence anti-TOMM20 (réseau mitochondrial) au marquage des différentes isoformes de myosine.

Un défaut de fonctionnement de la chaîne respiratoire peut engendrer des défauts de dynamique mitochondriale, amenant à une fragmentation du réseau (Benard et al., 2007). À l'inverse, une fragmentation du réseau, par mutation d'un intervenant protéique de la fusion par exemple, entraîne des défauts d'OXPPOS (Benard et al., 2007; Liesa and Shirihai, 2013). Ainsi, la morphologie du réseau mitochondrial est étroitement liée à la fonction respiratoire de la cellule. Ceci est d'autant plus vrai dans les fibres musculaires, au réseau réticulé et au fort besoin énergétique. La fragmentation observée dans notre modèle pourrait donc participer au phénotype mitochondrial, et restaurer la morphologie du réseau pourrait améliorer le phénotype chez les individus malades. Plusieurs éléments porteraient à croire que cette fragmentation ne soit pas due à un excès de fission, mais plutôt à un défaut de fusion lié à une rigidification et à une modification de composition de la membrane externe mitochondriale (OMM) (*données de lipidomique sur OMM en attente*). Dans le cadre de cette hypothèse, nous pourrions donc envisager un traitement à l'aide d'acides gras spécifiques pour rétablir la composition de l'OMM, comme avec une diète cétogène ; cependant, celle-ci serait globale à l'organisme et n'a pour le moment pas été testée dans le cadre d'une myopathie centronucléaire. Elle a cependant fait ses preuves dans des maladies comme Alzheimer (Wang et al., 2017) ou Huntington (Guo et al., 2013) ; plus particulièrement, elle provoque aussi le ralentissement de la progression d'une myopathie mitochondriale (Ahola-Erkkilä et al., 2010), ainsi que des améliorations dans des atteintes musculaires dues à des causes neurodégénératives (Paoli et al., 2014). Bien que cette hypothèse soit envisageable, on peut aussi entrevoir une stratégie de modulation de la morphologie mitochondriale par la modification de certains intervenants protéiques ; ceci devrait fonctionner, même si dans notre cas leur expression n'est pas modifiée. Notre hypothèse étant que la composition et les caractéristiques physiques de l'OMM empêchent une fusion optimale des mitochondries, l'approche reposerait non pas sur une augmentation de la fusion mais plutôt une inhibition de la fission. Cette approche pourrait être prometteuse, puisque dans les myoblastes primaires, nous avons observé un léger effet du mdivi1 sur les myoblastes *Hacd1*-KO, suggérant qu'une marge de compensation est possible. La réduction de la fission mitochondriale peut s'envisager *via* des drogues agissant sur toute protéine principale ou accessoire de la fission, mais la plupart des études se penchent sur des inhibiteurs directs ou indirects de DRP1. Ainsi, une amélioration de la morphologie du réseau par la modulation de la fission mitochondriale a été observée avec l'utilisation de mdivi1, d'une molécule appelée empagliflozine ou encore à l'aide de peptides inhibiteurs, comme P110 ou PPD1 qui inhibent la déphosphorylation de DRP1 par la calcineurine (Cereghetti et al., 2008, 2010; Cui et al., 2010; Qi et al., 2013; Zhou et al., 2018). Cependant, il est possible que la modulation et la stabilisation de la CL puissent suffire à rétablir la fonction mitochondriale sans avoir besoin de modifier la morphologie, et que celle-ci s'adaptera à une respiration restaurée.

Afin de pouvoir confirmer notre hypothèse, il serait éclairant de pouvoir visualiser la dynamique mitochondriale. En effet, la quantification des événements de fusion et fission, ainsi que la proportion de rapprochements mitochondriaux aboutissant à une fusion seraient des données en faveur ou non de notre hypothèse. Dans cette optique, nous allons réaliser de l'imagerie sur myoblastes et myotubes primaires par *time-lapses* pour quantifier ces événements. Cependant, il semblerait que la fragmentation ne soit pas encore visible à ces stades, et qu'il serait donc éventuellement impossible de voir une différence de comportement entre mitochondries WT et *Hacd1*-KO. S'il faut à la fois l'expression d'*Hacd1* et l'augmentation de la masse mitochondriale afin de voir la fragmentation, nous allons en parallèle évaluer la dynamique sur des fibres musculaires d'individus adultes. Néanmoins, ces cellules possèdent un encombrement stérique très important et une faible possibilité de mouvements pour les mitochondries, ce qui réduit la possibilité d'une dynamique forte des mitochondries au sein de la fibre. On observe dans ces cellules une régionalisation, une compartimentalisation des mitochondries appartenant aux différents noyaux de la fibre, qui restent dans leurs alentours et ne se mélangent qu'au niveau de zones limites entre deux populations de deux noyaux limitrophes (Mishra et al., 2015) ; ceci a été plusieurs fois mis en lumière, dans des fibres de souris âgées ou de patients atteints de myopathies mitochondriales (Elson et al., 2002; Wanagat et al., 2001). De plus, il a été montré que non seulement le type de fibres, mais aussi l'âge des individus est primordial pour visualiser la dynamique mitochondriale (Mishra et al., 2015) ; il serait donc préférable de réaliser cette étude dynamique sur des jeunes souris de 10 à 14 jours, afin de voir une dynamique mitochondriale suffisamment importante pour appuyer ou infirmer notre hypothèse.

Une autre approche pour tester l'hypothèse d'un défaut de fusion directement lié à une modification de l'OMM est la réalisation de fusion *in vitro* à l'aide de mitochondries isolées, comme décrit par Schauss *et al.* (Schauss et al., 2010), où des mitochondries isolées sont mises à fusionner dans un tampon optimisé. Nous n'avons cependant pas pu mettre en évidence de différence de fusion entre mitochondries WT et *Hacd1*-KO par cette approche. Le fait qu'il s'agisse de conditions artificielles pourrait en partie expliquer cette absence de phénotype. Il est aussi possible, vu les différences entre muscles plus ou moins oxydatifs, que nous ayons dilué notre effet en préparant des mitochondries à partir de tous les muscles des souris ; en effet, nous avons précédemment observé une atteinte mitochondriale différente en fonction des muscles ayant des profils oxydatifs différents.

Même si cela était loin d'être significatif, nous avons pu remarquer que l'ajout de cytoplasme de gastrocnémien de souris WT semblait changer la cinétique, avec une fusion potentiellement plus rapide chez les WT que les *Hacd1*-KO, avec un pic à 15 minutes chez les WT et une progression lente et constante pour les *Hacd1*-KO. Ainsi, en rapprochant les conditions vers un milieu plus physiologique, une différence de cinétique pourrait s'observer, pouvant expliquer qu'en fibres on observe une fragmentation : si la fusion est ralentie mais que la fission est à son taux normal, l'équilibre n'est pas respecté et il y a fragmentation. Une autre explication serait que des objets plus gros sont moins stables et qu'ils subissent peut-être

plus fortement les vibrations dues aux étapes suivantes et se fragmentent. De plus, le gastrocnémien étant un muscle plutôt glycolytique, il serait intéressant d'utiliser du cytoplasme extrait d'un muscle plus oxydatif pour comparer les effets ; en effet, il est possible que ces sérums diffèrent par leur composition notamment protéique des intervenants solubles de la dynamique (tel *Drp1*), puisque les réseaux n'ont pas la même morphologie en fonction de ces tissus (Mishra et al., 2015).

Si nous arrivons à établir des conditions de fusion optimisée et observons un défaut de fusion des mitochondries *Hacd1-KO*, nous essaierons de confirmer le rôle de la composition lipidique. Si nous parvenons à établir des conditions de fusion optimisées et observons un défaut de fusion des mitochondries *Hacd1-KO*, nous essaierons de conclure sur le rôle de la composition lipidique des membranes mitochondriales dans la fragmentation en testant l'effet du cytoplasme de souris WT et de souris *Hacd1-KO*. Si notre hypothèse est bonne, les mitochondries devraient avoir le même comportement quel que soit le cytoplasme. Nous pourrions aussi envisager des fusions hybrides de mitochondries WT et *Hacd1-KO*. Toutes ces conditions pourraient nous permettre de mettre en évidence toutes les composantes de notre modèle, protéiques comme lipidiques, ainsi que l'importance de la provenance du cytoplasme et du type de fibres du muscle dont sont extraits le cytoplasme et les mitochondries.

Un autre élément de variation de notre expérience est qu'elle ne possédait pas le même *read-out* que celle présentée dans la méthodologie (Schauss et al., 2010). En effet, cette dernière propose l'utilisation de deux populations mitochondriales permettant chacune l'expression de la moitié de la protéine de la Luciférase et un *zipper* leucine permettant leur liaison. Ainsi, si les mitochondries fusionnent et qu'il y a mélange des matrices, on observe un signal bioluminescent. Or, ce système ne montre pas de cinétique comme le nôtre car c'est un système *on/off*, alors que nous observons des variations de populations de tailles différentes. Ainsi, le problème de stabilité que nous supposons après 15 minutes chez les WT (potentiellement dû à la forte proportion de grands objets observés) ne serait pas visible dans le système proposé dans la publication, alors qu'il se traduirait dans notre modèle par une diminution du nombre de grands objets. Notre système présente donc une population au cours du temps, contrairement à celui présenté qui, plus robuste, présente un résultat final de fusion globale. Pour vérifier la possible instabilité de nos échantillons, nous pourrions fixer des extraits à chaque temps pour visualisation en microscopie électronique : ainsi, nous pourrions voir d'une part si les fusions ne sont pas des hémifusions – très peu stables – de l'OMM, ou bien s'il y a vraiment de gros objets correctement fusionnés ; cette deuxième observation appuierait l'hypothèse du manque de stabilité.

MITOPLD, UNE PHOSPHOLIPASE MITOCHONDRIALE QUI POURRAIT EXPLIQUER LA FRAGMENTATION DANS LE MODELE HACD1-KO

Nous avons vu dans notre étude une fragmentation du réseau mitochondrial dans les fibres musculaires des souris *Hacd1-KO*. Celle-ci semble due à un défaut de fusion possiblement lié à la modification de la rigidité membranaire de l'OMM des individus *Hacd1-KO*. De plus, ces individus présentent des défauts de respiration mitochondriale, avec un défaut de couplage dû à une forte diminution de la CL, phospholipide de l'IMM essentiel au fonctionnement normal de la chaîne respiratoire. Notre modèle illustre donc le lien entre perturbation de synthèse des phospholipides mitochondriaux et modification métabolique. Ce lien pourrait lui aussi participer à la fragmentation du réseau par la diminution de phospholipides, et en particulier de la CL (Ha and Frohman, 2014). En effet, si nous avons précédemment émis l'hypothèse que la possible modification de composition de l'OMM, provoquant sa rigidification, pouvait être à la base du défaut de fusion, il faut aussi entrevoir une perturbation de la fusion par dérégulation de la CL. En 2006, une équipe américaine a identifié un membre ancestral de la famille des phospholipases D à la surface des mitochondries, appelée mitoPLD. Cette superfamille se compose d'enzymes modificateuses de lipides ; mitoPLD intervient dans l'hydrolyse de CL en acide phosphatidique (PA) (Choi et al., 2006b), qui favorise les courbures membranaires essentielles lors des événements de fusion. La particularité de cette enzyme est qu'elle favorise la fusion mitochondriale en rapprochant les mitochondries par l'hydrolyse de CL de l'OMM de la mitochondrie opposée. En effet, l'OMM contient entre 10 et 20% des CL mitochondriales (Hovius et al., 1993), particulièrement dans son feuillet externe ; ces CL proviennent à la fois de la translocation de l'IMM vers l'OMM (Liu et al., 2003), mais aussi du transit entre le RE et la mitochondrie lors de leur maturation. Ainsi, ces CL peuvent être hydrolysées par la mitoPLD de la mitochondrie en contact, ce qui provoque leur rapprochement et enclenche la fusion *via* les mitofusines (Choi et al., 2006b). On pourrait donc comprendre que dans notre modèle, la CL est potentiellement diminuée sur l'OMM (*données de lipidomique en attente*), et que ce rapprochement se fasse moins bien, avec une diminution de l'initiation de la fusion (figure 26).

Ce modèle est d'autant plus intéressant que le PA généré par mitoPLD est, en plus de son rôle de stabilisateur des fortes courbures membranaires, régulateur de fission : en effet, mitoPLD se lie à DRP1 et le place dans un environnement inhibiteur de fission, puisque riche en PA (Adachi et al., 2016; Kashatus, 2016). Ceci est dû à la liaison de DRP1 au PA, qui empêcherait la formation de l'anneau de constriction ainsi que l'hydrolyse de GTP nécessaire à sa constriction (Huang et al., 2011; Zhang et al., 2016). Ces éléments appuient une possible implication de mitoPLD dans notre modèle (figure 26).

A ceci s'ajoute le fait que le phosphatidylinositol (4,5) biphosphate (PIP₂) est un co-activateur de mitoPLD et que sa diminution provoque une fragmentation du réseau mitochondrial (Rosivatz and Woscholski, 2011). Or le PIP₂ est essentiellement synthétisé à partir de PI, lui aussi fortement réduit chez les individus *Hacd1*-KO.

On remarque donc que mitoPLD agit en tant qu'activateur de fusion et inhibiteur de fission, et qu'au-delà, les CL sont au cœur du phénotype mitochondrial de nos individus, par régulation du couplage et de la morphologie. Les résultats de lipidomique sur OMM sont donc très attendus, car ils nous permettront peut-être de lier les CL à la fragmentation observée. Le cas échéant, nous pourrions vérifier la localisation d'OPA1, la fonction enzymatique de mitoPLD *in vitro* dans des myotubes et myofibres WT et *Hacd1*-KO, ainsi que l'association de DRP1 à PA et mitoPLD pour confirmer cette hypothèse. Tout ceci en parallèle d'un sauvetage par ajout de CL d'une part et de PA d'autre part à l'aide de fusion entre mitochondries et vésicules lipidiques.

L'ensemble de ce travail montre l'importance de la composition lipidique des membranes mitochondriales dans leur structure et la fonction mitochondriale mais aussi, potentiellement, dans leur dynamique.

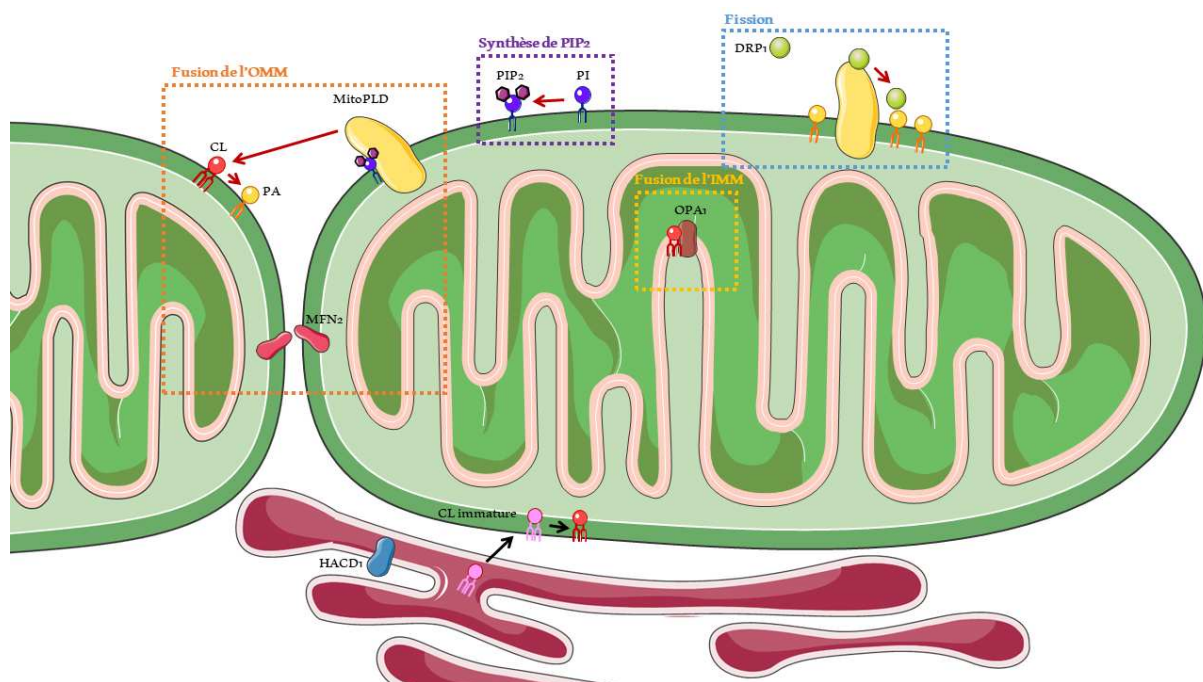


Figure 26 : Hypothèse d'une implication directe de la cardiolipine dans la fragmentation mitochondriale chez les souris *Hacd1*-KO. La cardiolipine (CL) est directement impliquée dans la fusion de l'IMM par la stabilisation du facteur OPA1, effecteur de ce processus (encadré jaune). Cependant, elle intervient aussi indirectement dans la fusion de l'OMM. En effet, elle est hydrolysée en PA par une phospholipase D (PLD) ancestrale bactérienne observée sur l'OMM des mitochondries, mitoPLD. Cette enzyme a la particularité d'hydrolyser la CL présente sur une mitochondrie proche, permettant le rapprochement des deux et favorisant la fusion *via* MFN2 (encadré orange). De plus, mitoPLD nécessite du PIP₂ comme cofacteur, synthétisé entre

autres à partir de PI (encadré violet). Enfin, mitoPLD participe aussi à l'inhibition de la fission en se liant à DRP1, qu'elle contribue à lier au PA qui l'inhibe (encadré bleu).

Ainsi, dans notre modèle (voir signalétique jaune), on peut supposer que la diminution de CL et de PI puisse diminuer ces mécanismes, provoquant d'une part moins de substrat pour mitoPLD et d'autre part moins de PIP2, cofacteur de mitoPLD. De plus, la fragmentation peut résulter d'une hémifusion de l'OMM mais d'un blocage de fusion de l'IMM, par exemple par un manque de stabilité d'OPA1 engendré par le manque de CL dans l'IMM. Enfin, DRP1 est peut-être plus actif chez les *Hacd1*-KO par défaut de PA pour l'inhiber.

CL = cardiolipine, *PA* = acide phosphatidique, *PI* = phosphatidylinositol, *PIP2* = phosphatidylinositol (4,5) biphosphate, *MFN2* = mitofusine 2, *OPA1* = optical atrophy 1, *DRP1* = dynamin-like related protein 1

HACD1, D'UNE THERAPIE DES SYNDROMES METABOLIQUES VERS UN TRAITEMENT HORMONAL

La perte de fonction du gène *Hacd1* génère une myopathie qui s'accompagne d'une augmentation du métabolisme basal. Dans le contexte actuel, les syndromes métaboliques deviennent une cause de santé publique majeure (Hruby and Hu, 2015). Tous les traitements jusqu'alors proposés d'augmentation du métabolisme étaient systémiques ; nous avons prouvé qu'une élévation spécifique du muscle est suffisante pour voir un effet global. C'est ainsi que nous avons émis l'hypothèse que si l'invalidation d'*Hacd1* se faisait après le développement musculaire, nous pourrions mimer cet effet métabolique en évitant l'aspect myopathique. En effet, d'une part l'hypotrophie musculaire est liée à un défaut de fusion au cours du développement et d'autre part, les souris *Hacd1*^{+/*KO*}, qui ne présentent aucune altération musculaire, présentent déjà une protection contre l'obésité. Il est donc raisonnable de penser que l'on pourrait obtenir une inactivation partielle d'*Hacd1* qui confère un avantage métabolique sans altérer la fonction musculaire.

Pour cela, nous avons réalisé une étude pilote à l'aide d'un AAV exprimant un shRNA contre *Hacd1* injecté directement par voie intramusculaire chez des individus WT. Nous avons remarqué après trois mois une tendance à une diminution du couplage mitochondrial comme observé chez les individus *Hacd1*-KO. Ainsi, nous allons procéder à une expérience avec injection systémique cette fois, en vérifiant entre autres l'efficacité métabolique ainsi que la préservation des performances musculaires. Cette expérience génère un grand espoir dans le cadre du traitement des syndromes métaboliques et obésités morbides, pour lesquels l'exercice est difficile et peu efficace ; dans le cas d'une réponse positive à cette expérience, nous pourrions envisager de tester cette stratégie sur des animaux rendus préalablement obèses, ainsi que sur des souris génétiquement obèses. Le traitement prometteur pourrait dès lors être proposé aux patients, que ce soit par une stratégie AAV ou oligonucléotides antisens contre *Hacd1*. De plus, nous réalisons en collaboration avec deux équipes de levuristes (équipes de Marc Blondel (Université de Brest) et Mickael Cohen (IBPC, Paris)) un crible en

levure de molécules inhibitrices d'*Hacd1* afin de trouver des molécules pouvant mimer cet effet respiratoire.

En plus de cette expérience, nous avons utilisé une approche d'induction de la délétion d'*Hacd1* à l'aide du tamoxifène ; cependant, les animaux *Hacd1^{cko/KO} ; HSA-CreERT2+*, avec un taux de recombinaison de plus de 80%, ne présentaient pas les modifications métaboliques des individus *Hacd1*-KO dont ils devaient être équivalents, comme si un élément venait provoquer un sauvetage du phénotype.

C'est dans le cadre de cette hypothèse que nous avons découvert que le tamoxifène pouvait potentiellement expliquer cette absence de phénotype. Cette molécule, approuvée par la FDA (*Food and Drug Administration*) et l'AEM (Agence Européenne du Médicament), est utilisée dans le cadre du traitement de cancers hormono-dépendants, en particulier le cancer du sein (Huang et al., 2015). Le tamoxifène se comporte comme un antagoniste des œstrogènes dans le sein mais un agoniste dans la plupart des tissus dont le muscle. Il a été récemment montré que le tamoxifène pouvait corriger les caractéristiques de la myopathie de Duchenne chez la souris (Dorchies et al., 2013) et de la myopathie liée à la délétion de *Mtm1*, létale avant 70 jours sans traitement (Gayi et al., 2018). Ces études sous-tendent que l'utilisation de tamoxifène puisse servir de traitement pour plusieurs myopathies très différentes, donc possiblement aussi celle provoquée par la délétion du gène *Hacd1* ; cette hypothèse est soutenue par notre étude précédente avec induction de la recombinaison à l'aide de tamoxifène, ainsi que par le fait qu'en dehors d'une hypotrophie musculaire franche, les femelles *Hacd1*-KO ont un phénotype métabolique discret. Nous avons donc amorcé une étude sur des individus *Hacd1*-KO, chez qui nous allons tester un sauvetage phénotypique à l'aide d'une administration continue de tamoxifène dans la nourriture dès le sevrage. Les individus traités seront soumis à des tests métaboliques et exercices sur tapis roulant et nous vérifierons la respiration mitochondriale sur tissus.

Enfin, pour pouvoir tester l'effet de l'inactivation d'*Hacd1* à l'âge adulte, nous allons aussi nous appuyer sur un modèle d'inactivation génétique induite non pas par le tamoxifène mais à l'aide de la doxycycline (Rao and Monks, 2009). En effet, nous invaliderons *Hacd1* dans notre modèle de KO conditionnel dans le muscle en administrant de la doxycycline, un antibiotique d'action très courte, pour activer un transactivateur qui se fixe sur le promoteur de *HSA-CRE*, provoquant une expression de la CRE dans le muscle et donc une recombinaison spécifique du muscle. Ainsi, nous pourrons évaluer dans ce contexte expérimental l'efficacité de recombinaison, ainsi que les caractéristiques métaboliques et musculaires des individus. En outrepassant la composante hormonale apportée par le tamoxifène, nous espérons ainsi conclure à une possible dissociation des aspects mitochondriaux et développementaux liés à la perte de fonction d'*Hacd1*.

DNM2 ET CD9, DES GENES « MEDICAMENTS » POUR HACD1 ?

L'idée d'un traitement commun à plusieurs myopathies fondé sur des similitudes physiopathologiques émerge de plus en plus, et notamment dans le cadre des myopathies centronucléaires. Ainsi, *Dnm2* apparaît aujourd'hui comme un candidat idéal, puisque sa modulation permet de corriger des caractéristiques myopathiques dans la myopathie due à la perte de fonction de *Bin1* (Cowling et al., 2017) ou de *Mtm1* (Tasfaout et al., 2017) ou encore à l'expression d'une forme dominante positive de *Dnm2* (Buono et al., 2018). Ainsi, nous avons voulu tester cette hypothèse dans notre modèle, en croisant des souris de fonds 129PAS hétérozygotes pour l'allèle KO de *Dnm2* (le KO complet étant létal) avec nos individus de fonds C57Bl/6N mutants pour *Hacd1* afin d'obtenir des WT, des *Hacd1*-KO, des hétérozygotes pour *Dnm2* et des doubles mutants (*Hacd1*-KO ; *Dnm2*^{+KO}). Ce type de croisement entre lignées différentes avait déjà été réalisé par nos collaborateurs avec des individus analysés en F1 (Cowling et al., 2014b). Nous avons évalué les caractéristiques musculaires et locomotrices des individus, qui se sont avérés ne présenter aucun phénotype, y compris pour les *Hacd1*-KO. Nous avons aussi remarqué qu'en HFD et en respiration, les individus hétérozygotes pour *Dnm2* avaient des valeurs supérieures, et que ce génotype était souvent associé à des individus agoutis. Cette absence de phénotype des animaux *Hacd1*-KO, qui nous a empêché de tester un effet potentiellement correcteur de la mutation *Dnm2*, pourrait être due à la différence de fonds génétiques entre les individus : en effet, il a été plusieurs fois rapporté qu'il existe des différences majeures entre les lignées de souris, que ce soit au niveau comportemental (Bothe et al., 2005), métabolique (Kahle et al., 2013) ou encore musculaire, notamment dans cet exemple de délétion de *Mtm1* dans un modèle 129PAS (Al-Qusairi et al., 2009) qui donne un phénotype plus sévère et une évolution plus homogène que celui généré par la même équipe en C57Bl/6j (Buj-Bello et al., 2002). Ainsi, peut-être que la perte du phénotype dans notre modèle peut s'expliquer par une différence hormonale entre les souches qui perturberait notre phénotype comme on a pu le voir dans le cas des individus traités au tamoxifène. De plus, il semblerait que le gène *Dnm2* se transmette plus souvent avec l'allèle agouti, suggérant une forte liaison de fonds génétique. Il faut ajouter que ce modèle ne nous a pas permis de visualiser si sa réduction pouvait sauver la fragmentation du réseau mitochondrial, puisque les souris *Hacd1*-KO ne présentaient pas de fragmentation dans ce fonds mixte ; cette observation aurait pu s'ajouter à la réflexion actuelle quant à l'implication réelle de *Dnm2* comme effecteur final de la fission mitochondriale, aujourd'hui remise en cause (Fonseca et al., 2019; Kraus and Ryan, 2017). Enfin, elle nous aurait permis de conclure sur un traitement commun des CNMs à l'aide d'une modulation de *Dnm2*. Pour la réaliser, nous envisageons de réaliser la diminution de *Dnm2* par l'utilisation d'oligonucléotides antisens, déjà disponibles chez nos collaborateurs (Tasfaout et al., 2017).

Sur le versant développemental, nous avons envisagé une correction de la taille des fibres musculaires par ablation de la tétraspanine *Cd9*, qui inhibe la fusion des myoblastes lors du développement (Tachibana and Hemler, 1999). Nous n'avons cependant observé aucune

différence de masses musculaire ou corporelle entre les individus *Hacd1*-KO et *Hacd1*-KO ; *Cd9*-KO. Cependant, ces derniers présentaient une normalisation de la VMA (non significative) et surtout, une tendance à une amélioration de l'endurance, revenue à une valeur similaire aux WT. Ainsi, bien que nous prévoyions de vérifier s'il y a ou non augmentation du diamètre des fibres chez les doubles KO par rapport aux *Hacd1*-KO, la conclusion la plus palpable de l'expérience serait l'amélioration locomotrice. Dans ce cas, un criblé pharmacologique serait possible pour identifier des molécules modulatrices de *Cd9*. De plus, il a été montré que ce gène agit en parallèle avec la tétraspanine *Cd81* (Charrin et al., 2013) pour moduler négativement la fusion des myoblastes, et éviter une surfusion des cellules. Il faudrait donc peut-être envisager une étude avec cette tétraspanine, peut-être plus efficace, ou bien avec les deux, puisque leurs effets sont décrits comme synergiques.

Ces études sont intéressantes puisqu'elles apportent des pistes supplémentaires de compréhension de la physiopathologie, ainsi que d'approches thérapeutiques. De plus, le nombre croissant de familles de patients identifiées ayant une perte de fonction du gène *Hacd1* en fait un gène d'importance croissante en myologie. Les enfants atteints par cette déficience sont très symptomatiques, ayant notamment des difficultés à s'alimenter dans les premiers mois post-natals. Ainsi, il serait intéressant de pouvoir développer un traitement pour ces stades précoces de la maladie.

LE MODELE MURIN HACD1-KO, UN NOUVEAU MODELE D'ETUDE DE L'IMPORTANCE DES AGTLC ET DE LA CL

Le modèle *Hacd1*-KO est donc un modèle spontané de réduction de la quantité des phospholipides mitochondriaux, en particulier de la CL. Contrairement à la plupart des modèles décrits jusqu'ici, HACD1 n'intervient pas directement dans la voie de synthèse de la CL, en faisant un modèle original, probablement en amont de la synthèse de ce phospholipide essentiel, potentiellement via la synthèse de C18 :2, le composant principal des CL dans le muscle. Ce modèle est au croisement des myopathies mitochondriales et centronucléaires, partageant des caractéristiques communes aux deux, et appuyant l'intérêt d'une caractérisation mécanistique plutôt qu'histologique des myopathies.

Ce modèle se caractérise par un phénotype musculaire en parallèle d'une élévation globale du métabolisme basal par réduction du couplage dans les muscles squelettiques. Le lien entre ces phénotypes est une modification de la composition lipidique des membranes avec en particulier des conséquences sur la fusion des myoblastes et le fonctionnement mitochondrial (Blondelle et al., 2015; Prola et al., 2021). Il nous reste à déterminer dans les. Années futures les

mécanismes moléculaires permettant à HACD1 de participer à la synthèse des phospholipides membranaires.

Enfin, notre travail a permis d'accroître la connaissance des rôles pléiotropes remplis par la CL : en plus de ses rôles connus dans la formation des crêtes mitochondriales, la stabilité des complexes respiratoires et la dynamique membranaire, il illustre son rôle direct dans le couplage mitochondrial (Prola et al., 2021).

BIBLIOGRAPHIE

- Abbasi-Moheb, L., Westenberger, A., Alotaibi, M., Alghamdi, M.A., Hertecant, J.L., Ariamand, A., Beetz, C., Rolfs, A., Bertoli-Avella, A.M., and Bauer, P. (2020). Biallelic loss-of-function HACD1 variants are a bona fide cause of congenital myopathy. *Clin. Genet.*
- Adachi, Y., Itoh, K., Yamada, T., Cervený, K.L., Suzuki, T.L., Macdonald, P., Frohman, M.A., Ramachandran, R., Iijima, M., and Sesaki, H. (2016). Coincident Phosphatidic Acid Interaction Restrains Drp1 in Mitochondrial Division. *Mol. Cell* 63, 1034–1043.
- Adhihetty, P.J., Uguccioni, G., Leick, L., Hidalgo, J., Pilegaard, H., and Hood, D.A. (2009). The role of PGC-1 α on mitochondrial function and apoptotic susceptibility in muscle. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* 297, C217–C225.
- Adhihetty, P.J., O’Leary, M.F.N., Chabi, B., Wicks, K.L., and Hood, D.A. (2020). Effect of denervation on mitochondrially mediated apoptosis in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol.* 102.
- Agbaga, M.-P., Mandal, M.N.A., and Anderson, R.E. (2010). Retinal very long-chain PUFAs: new insights from studies on ELOVL4 protein. *J. Lipid Res.* 51, 1624–1642.
- Ahola-Erkkilä, S., Carroll, C.J., Peltola-Mjösund, K., Tulkki, V., Mattila, I., Seppänen-Laakso, T., Oresic, M., Tynynmaa, H., and Suomalainen, A. (2010). Ketogenic diet slows down mitochondrial myopathy progression in mice. *Hum. Mol. Genet.* 19, 1974–1984.
- Akepati, V.R., Müller, 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.
- Akimoto, T., Pohnert, S.C., Li, P., Zhang, M., Gumbs, C., Rosenberg, P.B., Williams, R.S., and Yan, Z. (2005). Exercise Stimulates Pgc-1 α Transcription in Skeletal Muscle through Activation of the p38 MAPK Pathway. *J. Biol. Chem.* 280, 19587–19593.
- Al Amrani, F., Gorodetsky, C., Hazrati, L.-N., Amburgey, K., Gonorazky, H.D., and Dowling, J.J. (2020). Biallelic LINE insertion mutation in HACD1 causing congenital myopathy. *Neurol. Genet.* 6.
- Aldahmesh, M.A., Mohamed, J.Y., Alkuraya, H.S., Verma, I.C., Puri, R.D., Alaiya, A.A., Rizzo, W.B., and Alkuraya, F.S. (2011). Recessive Mutations in ELOVL4 Cause Ichthyosis, Intellectual Disability, and Spastic Quadriplegia. *Am. J. Hum. Genet.* 89, 745–750.
- Al-Qusairi, L., Weiss, N., Toussaint, A., Berbey, C., Messaddeq, N., Kretz, C., Sanoudou, D., Beggs, A.H., Allard, B., Mandel, J.-L., et al. (2009). T-tubule disorganization and defective excitation-contraction coupling in muscle fibers lacking myotubularin lipid phosphatase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 18763–18768.
- Amoasii, L., Hnia, K., Chicanne, G., Brech, A., Cowling, B.S., Müller, M.M., Schwab, Y., Koebel, P., Ferry, A., Payrastre, B., et al. (2013). Myotubularin and PtdIns3P remodel the sarcoplasmic reticulum in muscle in vivo. *J. Cell Sci.* 126, 1806–1819.

- Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E., and Langer, T. (2014). The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *J. Cell Biol.* *204*, 919–929.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., et al. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* *290*, 457–465.
- Ardail, D., Privat, J.P., Egret-Charlier, M., Levrat, C., Lerme, F., and Louisot, P. (1990). Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J. Biol. Chem.* *265*, 18797–18802.
- Aversa, A., Palleschi, S., Cruccu, G., Silvestroni, L., Isidori, A., and Fabbri, A. (1998). Rapid decline of fertility in a case of adrenoleukodystrophy. *Hum. Reprod.* *13*, 2474–2479.
- 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.
- Bach, L., Michaelson, L.V., Haslam, R., Bellec, Y., Gissot, L., Marion, J., Da Costa, M., Boutin, J.-P., Miquel, M., Tellier, F., et al. (2008). The very-long-chain hydroxy fatty acyl-CoA dehydratase PASTICCINO2 is essential and limiting for plant development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 14727–14731.
- Bacman, S.R., Williams, S.L., Pinto, M., and Moraes, C.T. (2014). The use of mitochondria-targeted endonucleases to manipulate mtDNA. *Methods Enzymol.* *547*, 373–397.
- Ban-Ishihara, R., Ishihara, T., Sasaki, N., Mihara, K., and Ishihara, N. (2013). Dynamics of nucleoid structure regulated by mitochondrial fission contributes to cristae reformation and release of cytochrome c. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *110*, 11863–11868.
- Barazzoni, R., Short, K.R., and Nair, K.S. (2000). Effects of Aging on Mitochondrial DNA Copy Number and Cytochrome c Oxidase Gene Expression in Rat Skeletal Muscle, Liver, and Heart *. *J. Biol. Chem.* *275*, 3343–3347.
- Barthélémy, I., Hitte, C., and Tiret, L. The Dog Model in the Spotlight: Legacy of a Trustful Cooperation. *J. Neuromuscul. Dis.* *6*, 421–451.
- Baskin, K.K., Winders, B.R., and Olson, E.N. (2015). Muscle as a “Mediator” of Systemic Metabolism. *Cell Metab.* *21*, 237–248.
- Beggs, A.H., Böhm, J., Snead, E., Kozlowski, M., Maurer, M., Minor, K., Childers, M.K., Taylor, S.M., Hitte, C., Mickelson, J.R., et al. (2010). MTM1 mutation associated with X-linked myotubular myopathy in Labrador Retrievers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 14697–14702.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., and Rossignol, R. (2007). Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J. Cell Sci.* *120*, 838–848.

- Berg, J.M., Tymoczko, J.L., and Stryer, L. (2002). The Utilization of Fatty Acids as Fuel Requires Three Stages of Processing. *Biochem.* 5th Ed.
- Bergeron, R., Ren, J.M., Cadman, K.S., Moore, I.K., Perret, P., Pypaert, M., Young, L.H., Semenkovich, C.F., and Shulman, G.I. (2001). Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 281, E1340-1346.
- Bi, P., Ramirez-Martinez, A., Li, H., Cannavino, J., McAnally, J.R., Shelton, J.M., Sánchez-Ortiz, E., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2017). Control of muscle formation by the fusogenic micropeptide myomixer. *Science* 356, 323–327.
- Biancalana, V., Romero, N.B., Thuestad, I.J., Ignatius, J., Kataja, J., Gardberg, M., Héron, D., Malfatti, E., Oldfors, A., and Laporte, J. (2018). Some DNM2 mutations cause extremely severe congenital myopathy and phenocopy myotubular myopathy. *Acta Neuropathol. Commun.* 6, 93.
- Biermans, W., Bakker, A., and Jacob, W. (1990). Contact sites between inner and outer mitochondrial membrane: A dynamic microcompartment for creatine kinase activity. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1018, 225–228.
- Birk, A.V., Liu, S., Soong, Y., Mills, W., Singh, P., Warren, J.D., Seshan, S.V., Pardee, J.D., and Szeto, H.H. (2013). The mitochondrial-targeted compound SS-31 re-energizes ischemic mitochondria by interacting with cardiolipin. *J. Am. Soc. Nephrol. JASN* 24, 1250–1261.
- Birk, A.V., Chao, W.M., Bracken, C., Warren, J.D., and Szeto, H.H. (2014). Targeting mitochondrial cardiolipin and the cytochrome c/cardiolipin complex to promote electron transport and optimize mitochondrial ATP synthesis. *Br. J. Pharmacol.* 171, 2017–2028.
- Bitoun, M., Maugenre, S., Jeannet, P.-Y., Lacène, E., Ferrer, X., Laforêt, P., Martin, J.-J., Laporte, J., Lochmüller, H., Beggs, A.H., et al. (2005). Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* 37, 1207–1209.
- Bitoun, M., Bevilacqua, J.A., Prudhon, B., Maugenre, S., Taratuto, A.L., Monges, S., Lubieniecki, F., Cances, C., Uro-Coste, E., Mayer, M., et al. (2007). Dynamin 2 mutations cause sporadic centronuclear myopathy with neonatal onset. *Ann. Neurol.* 62, 666–670.
- Blondelle, J., Ohno, Y., Gache, V., Guyot, S., Storck, S., Blanchard-Gutton, N., Barthélémy, I., Walmsley, G., Rahier, A., Gadin, S., et al. (2015). HACD1, a regulator of membrane composition and fluidity, promotes myoblast fusion and skeletal muscle growth. *J. Mol. Cell Biol.* 7, 429–440.
- Böhm, J., Yiş, U., Ortaç, R., Çakmakçı, H., Kurul, S.H., Dirik, E., and Laporte, J. (2010). Case report of intrafamilial variability in autosomal recessive centronuclear myopathy associated to a novel BIN1 stop mutation. *Orphanet J. Rare Dis.* 5, 35.
- Böhm, J., Biancalana, V., Dechene, E.T., Bitoun, M., Pierson, C.R., Schaefer, E., Karasoy, H., Dempsey, M.A., Klein, F., Dondaine, N., et al. (2012). Mutation spectrum in the large GTPase dynamin 2, and genotype-phenotype correlation in autosomal dominant centronuclear myopathy. *Hum. Mutat.* 33, 949–959.

- Böhm, J., Vasli, N., Maurer, M., Cowling, B., Shelton, G.D., Kress, W., Toussaint, A., Prokic, I., Schara, U., Anderson, T.J., et al. (2013). Altered Splicing of the BIN1 Muscle-Specific Exon in Humans and Dogs with Highly Progressive Centronuclear Myopathy. *PLOS Genet.* 9, e1003430.
- Böhm, J., Biancalana, V., Malfatti, E., Dondaine, N., Koch, C., Vasli, N., Kress, W., Strittmatter, M., Taratuto, A.L., Gonorazky, H., et al. (2014). Adult-onset autosomal dominant centronuclear myopathy due to BIN1 mutations. *Brain J. Neurol.* 137, 3160–3170.
- Bohnert, M., Wenz, L.-S., Zerbes, R.M., Horvath, S.E., Stroud, D.A., von der Malsburg, K., Müller, J.M., Oeljeklaus, S., Perschil, I., Warscheid, B., et al. (2012). Role of mitochondrial inner membrane organizing system in protein biogenesis of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Biol. Cell* 23, 3948–3956.
- Bothe, G.W.M., Bolivar, V.J., Vedder, M.J., and Geistfeld, J.G. (2005). Behavioral differences among fourteen inbred mouse strains commonly used as disease models. *Comp. Med.* 55, 326–334.
- Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2001). Tetraspanins. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 58, 1189–1205.
- Brdiczka, D. (1991). Contact sites between mitochondrial envelope membranes. Structure and function in energy- and protein-transfer. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* 1071, 291–312.
- Breckenridge, W.C., Morgan, I.G., Zanetta, J.P., and Vincendon, G. (1973). Adult rat brain synaptic vesicles II. Lipid composition. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.* 320, 681–686.
- Briolay, A., Jaafar, R., Nemoz, G., and Bessueille, L. (2013). Myogenic differentiation and lipid-raft composition of L6 skeletal muscle cells are modulated by PUFAs. *Biochim. Biophys. Acta* 1828, 602–613.
- Brocca, L., Cannavino, J., Coletto, L., Biolo, G., Sandri, M., Bottinelli, R., and Pellegrino, M.A. (2012). The time course of the adaptations of human muscle proteome to bed rest and the underlying mechanisms. *J. Physiol.* 590, 5211–5230.
- Buckingham, M.E. (1994). Muscle: the regulation of myogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 4, 745–751.
- Buj-Bello, A., Laugel, V., Messaddeq, N., Zahreddine, H., Laporte, J., Pellissier, J.-F., and Mandel, J.-L. (2002). The lipid phosphatase myotubularin is essential for skeletal muscle maintenance but not for myogenesis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 15060–15065.
- Buj-Bello, A., Fougerousse, F., Schwab, Y., Messaddeq, N., Spehner, D., Pierson, C.R., Durand, M., Kretz, C., Danos, O., Douar, A.-M., et al. (2008). AAV-mediated intramuscular delivery of myotubularin corrects the myotubular myopathy phenotype in targeted murine muscle and suggests a function in plasma membrane homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* 17, 2132–2143.

- Buono, S., Ross, J.A., Tasfaout, H., Levy, Y., Kretz, C., Tayefeh, L., Matson, J., Guo, S., Kessler, P., Monia, B.P., et al. (2018). Reducing dynamin 2 (DNM2) rescues DNM2-related dominant centronuclear myopathy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *115*, 11066–11071.
- Bustillo-Zabalbeitia, I., Montessuit, S., Raemy, E., Basañez, G., Terrones, O., and Martinou, J.-C. (2014). Specific Interaction with Cardiolipin Triggers Functional Activation of Dynamin-Related Protein 1. *PLoS ONE* *9*.
- Butler, M.H., David, C., Ochoa, G.-C., Freyberg, Z., Daniell, L., Grabs, D., Cremona, O., and Camilli, P.D. (1997). Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a Member of the Amphiphysin/Rvs Family, Is Concentrated in the Cortical Cytomatrix of Axon Initial Segments and Nodes of Ranvier in Brain and around T Tubules in Skeletal Muscle. *J. Cell Biol.* *137*, 1355–1367.
- Cadenas, S. (2018). Mitochondrial uncoupling, ROS generation and cardioprotection. *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* *1859*, 940–950.
- Cantó, C., and Auwerx, J. (2009). PGC-1alpha, SIRT1 and AMPK, an energy sensing network that controls energy expenditure. *Curr. Opin. Lipidol.* *20*, 98–105.
- Cantó, C., Houtkooper, R.H., Pirinen, E., Youn, D.Y., Oosterveer, M.H., Cen, Y., Fernandez-Marcos, P.J., Yamamoto, H., Andreux, P.A., Cettour-Rose, P., et al. (2012). The NAD(+) precursor nicotinamide riboside enhances oxidative metabolism and protects against high-fat diet-induced obesity. *Cell Metab.* *15*, 838–847.
- Canton, M., Menazza, S., and Di Lisa, F. (2014). Oxidative stress in muscular dystrophy: from generic evidence to specific sources and targets. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *35*, 23–36.
- Cereghetti, G.M., Stangherlin, A., Brito, O.M. de, Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P., and Scorrano, L. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 15803–15808.
- Cereghetti, G.M., Costa, V., and Scorrano, L. (2010). Inhibition of Drp1-dependent mitochondrial fragmentation and apoptosis by a polypeptide antagonist of calcineurin. *Cell Death Differ.* *17*, 1785–1794.
- Chang, K.-C., McCulloch, M.-L.C., and Anderson, T.J. (2010). Molecular and cellular insights into a distinct myopathy of Great Dane dogs. *Vet. J.* *183*, 322–327.
- Charrin, S., Latil, M., Soave, S., Polesskaya, A., Chrétien, F., Boucheix, C., and Rubinstein, E. (2013). Normal muscle regeneration requires tight control of muscle cell fusion by tetraspanins CD9 and CD81. *Nat. Commun.* *4*, 1–12.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003a). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* *160*, 189–200.
- Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003b). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* *160*, 189–200.

- 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.
- Chen, H., Ren, S., Clish, C., Jain, M., Mootha, V., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2015). Titration of mitochondrial fusion rescues Mfn-deficient cardiomyopathy. *J. Cell Biol.* *211*, 795–805.
- Chen, B., You, W., Wang, Y., and Shan, T. (2020). The regulatory role of Myomaker and Myomixer-Myomerger-Minion in muscle development and regeneration. *Cell Mol Life Sci* *77*, 1551–1569.
- Chernomordik, L.V., Kozlov, M.M., Melikyan, G.B., Abidor, I.G., Markin, V.S., and Chizmadzhev, Yu.A. (1985). The shape of lipid molecules and monolayer membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *812*, 643–655.
- Choi, S.-Y., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J., and Frohman, M.A. (2006a). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1255–1262.
- Choi, S.-Y., Huang, P., Jenkins, G.M., Chan, D.C., Schiller, J., and Frohman, M.A. (2006b). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat. Cell Biol.* *8*, 1255–1262.
- Claeys, K.G. (2020). Congenital myopathies: an update. *Dev. Med. Child Neurol.* *62*, 297–302.
- Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, M.E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, L.C., et al. (2013). Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency. *Cell* *155*, 160–171.
- Cogliati, S., Enriquez, J.A., and Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem. Sci.* *41*, 261–273.
- 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.
- Colombini, M., Blachly-Dyson, E., and Forte, M. (1996). VDAC, a Channel in the Outer Mitochondrial Membrane. In *Ion Channels*, (Springer, Boston, MA), pp. 169–202.
- Cowling, B.S., and Thielemans, L. (2020). Translational medicine in neuromuscular disorders: from academia to industry. *Dis. Model. Mech.* *13*.
- Cowling, B.S., Toussaint, A., Amoasii, L., Koebel, P., Ferry, A., Davignon, L., Nishino, I., Mandel, J.-L., and Laporte, J. (2011). Increased expression of wild-type or a centronuclear myopathy mutant of dynamin 2 in skeletal muscle of adult mice leads to structural defects and muscle weakness. *Am. J. Pathol.* *178*, 2224–2235.
- Cowling, B.S., Chevremont, T., Prokic, I., Kretz, C., Ferry, A., Coirault, C., Koutsopoulos, O., Laugel, V., Romero, N.B., and Laporte, J. (2014a). Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J. Clin. Invest.* *124*, 1350–1363.

- Cowling, B.S., Chevremont, T., Prokic, I., Kretz, C., Ferry, A., Coirault, C., Koutsopoulos, O., Laugel, V., Romero, N.B., and Laporte, J. (2014b). Reducing dynamin 2 expression rescues X-linked centronuclear myopathy. *J. Clin. Invest.* *124*, 1350.
- Cowling, B.S., Prokic, I., Tasfaout, H., Rabai, A., Humbert, F., Rinaldi, B., Nicot, A.-S., Kretz, C., Friant, S., Roux, A., et al. (2017). Amphiphysin (BIN1) negatively regulates dynamin 2 for normal muscle maturation. *J. Clin. Invest.* *127*, 4477–4487.
- Cresci, S., Wright, L.D., Spratt, J.A., Briggs, F.N., and Kelly, D.P. (1996). Activation of a novel metabolic gene regulatory pathway by chronic stimulation of skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* *270*, C1413-1420.
- Csordás, G., Renken, C., Várnai, P., Walter, L., Weaver, D., Buttle, K.F., Balla, T., Mannella, C.A., and Hajnóczky, G. (2006). Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J. Cell Biol.* *174*, 915–921.
- Cui, M., Tang, X., Christian, W.V., Yoon, Y., and Tieu, K. (2010). Perturbations in Mitochondrial Dynamics Induced by Human Mutant PINK1 Can Be Rescued by the Mitochondrial Division Inhibitor mdivi-1 *. *J. Biol. Chem.* *285*, 11740–11752.
- CUTTING, W.C., MEHRTENS, H.G., and TAINTER, M.L. (1933). ACTIONS AND USES OF DINITROPHENOL: PROMISING METABOLIC APPLICATIONS. *J. Am. Med. Assoc.* *101*, 193–195.
- Daum, G. (1985). Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* *822*, 1–42.
- 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.
- 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. *Hum. Genet.* *109*, 584–591.
- Demonbreun, A.R., and McNally, E.M. (2014). Dynamin 2 the rescue for centronuclear myopathy. *J. Clin. Invest.* *124*, 976.
- Denic, V., and Weissman, J.S. (2007). A molecular caliper mechanism for determining very long-chain fatty acid length. *Cell* *130*, 663–677.
- Diaz, F., and Moraes, C.T. (2008). Mitochondrial biogenesis and turnover. *Cell Calcium* *44*, 24–35.
- Dirks, M.L., Wall, B.T., van de Valk, B., Holloway, T.M., Holloway, G.P., Chabowski, A., Goossens, G.H., and van Loon, L.J.C. (2016). One Week of Bed Rest Leads to Substantial Muscle Atrophy and Induces Whole-Body Insulin Resistance in the Absence of Skeletal Muscle Lipid Accumulation. *Diabetes* *65*, 2862–2875.
- Dorchies, O., Gayi, E., Ismail, H., Neff, L., Cowling, B., Laporte, J., Dor, T., Fischer, D., Ruegg, U., and Scapozza, L. (2017). Repurposing tamoxifen for severe myopathies: from

preclinical evaluation in animal models to clinical trials in patients. *Neuromuscul. Disord.* 27, S219–S220.

Dorchies, O.M., Reutenauer-Patte, J., Dahmane, E., Ismail, H.M., Petermann, O., Patthey-Vuadens, O., Comyn, S.A., Gayi, E., Piacenza, T., Handa, R.J., et al. (2013). The anticancer drug tamoxifen counteracts the pathology in a mouse model of duchenne muscular dystrophy. *Am. J. Pathol.* 182, 485–504.

Dowling, J.J., Vreede, A.P., Low, S.E., Gibbs, E.M., Kuwada, J.Y., Bonnemann, C.G., and Feldman, E.L. (2009). Loss of Myotubularin Function Results in T-Tubule Disorganization in Zebrafish and Human Myotubular Myopathy. *PLoS Genet.* 5.

Dowling, J.J., Joubert, R., Low, S.E., Durban, A.N., Messaddeq, N., Li, X., Dulin-Smith, A.N., Snyder, A.D., Marshall, M.L., Marshall, J.T., et al. (2012). Myotubular myopathy and the neuromuscular junction: a novel therapeutic approach from mouse models. *Dis. Model. Mech.* 5, 852–859.

Dunglison, G.F., Scotting, P.J., and Wigmore, P.M. (1999). Rat embryonic myoblasts are restricted to forming primary fibres while later myogenic populations are pluripotent. *Mech. Dev.* 87, 11–19.

Durieux, A.-C., Vignaud, A., Prudhon, B., Viou, M.T., Beuvin, M., Vassilopoulos, S., Fraysse, B., Ferry, A., Lainé, J., Romero, N.B., et al. (2010). A centronuclear myopathy-dynamin 2 mutation impairs skeletal muscle structure and function in mice. *Hum. Mol. Genet.* 19, 4820–4836.

Durieux, A.-C., Vassilopoulos, S., Lainé, J., Fraysse, B., Briñas, L., Prudhon, B., Castells, J., Freyssenet, D., Bonne, G., Guicheney, P., et al. (2012). A centronuclear myopathy--dynamin 2 mutation impairs autophagy in mice. *Traffic Cph. Den.* 13, 869–879.

Egerman, M.A., and Glass, D.J. (2014). Signaling pathways controlling skeletal muscle mass. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 49, 59–68.

Egner, A., Jakobs, S., and Hell, S.W. (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 3370–3375.

Eisenberg, B.R. (2011). Quantitative Ultrastructure of Mammalian Skeletal Muscle. In *Comprehensive Physiology*, (American Cancer Society), pp. 73–112.

Elson, J.L., Samuels, D.C., Johnson, M.A., Turnbull, D.M., and Chinnery, P.F. (2002). The length of cytochrome c oxidase-negative segments in muscle fibres in patients with mtDNA myopathy. *Neuromuscul. Disord.* 12, 858–864.

Endo, T., Eilers, M., and Schatz, G. (1989). Binding of a tightly folded artificial mitochondrial precursor protein to the mitochondrial outer membrane involves a lipid-mediated conformational change. *J. Biol. Chem.* 264, 2951–2956.

Erdbrügger, P., and Fröhlich, F. (2021). The role of very long chain fatty acids in yeast physiology and human diseases. *Biol. Chem.* 402, 25–38.

- Fanaei, M., Monk, P.N., and Partridge, L.J. (2011). The role of tetraspanins in fusion. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 524–528.
- Feliu-Pascual, A.L., Shelton, G.D., Targett, M.P., Long, S.N., Comerford, E.J., McMillan, C., Davies, D., Rusbridge, C., Mellor, D., Chang, K.C., et al. (2006). Inherited myopathy of great Danes. *J. Small Anim. Pract.* 47, 249–254.
- Fetalvero, K.M., Yu, Y., Goetschkes, M., Liang, G., Valdez, R.A., Gould, T., Triantafellow, E., Bergling, S., Loureiro, J., Eash, J., et al. (2013). Defective Autophagy and mTORC1 Signaling in Myotubularin Null Mice. *Mol. Cell. Biol.* 33, 98–110.
- Finck, B.N., Bernal-Mizrachi, C., Han, D.H., Coleman, T., Sambandam, N., LaRiviere, L.L., Holloszy, J.O., Semenkovich, C.F., and Kelly, D.P. (2005). A potential link between muscle peroxisome proliferator-activated receptor- α signaling and obesity-related diabetes. *Cell Metab.* 1, 133–144.
- Flis, V.V., and Daum, G. (2013). Lipid transport between the endoplasmic reticulum and mitochondria. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 5.
- Fonseca, T.B., Sánchez-Guerrero, Á., Milosevic, I., and Raimundo, N. (2019). Mitochondrial fission requires DRP1 but not dynamins. *Nature* 570, E34–E42.
- Frey, T.G., and Mannella, C.A. (2000). The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem. Sci.* 25, 319–324.
- 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* 334, 358–362.
- Friedman, J.R., Mourier, A., Yamada, J., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2015). MICOS coordinates with respiratory complexes and lipids to establish mitochondrial inner membrane architecture. *ELife* 4.
- Fröhlich, C., Grabiger, S., Schwefel, D., Faelber, K., Rosenbaum, E., Mears, J., Rocks, O., and Daumke, O. (2013). Structural insights into oligomerization and mitochondrial remodelling of dynamin 1-like protein. *EMBO J.* 32, 1280–1292.
- Gaigg, B., Simbeni, R., Hrastnik, C., Paltauf, F., and Daum, G. (1995). Characterization of a microsomal subfraction associated with mitochondria of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. Involvement in synthesis and import of phospholipids into mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 1234, 214–220.
- Gammage, P.A., Rorbach, J., Vincent, A.I., Rebar, E.J., and Minczuk, M. (2014). Mitochondrially targeted ZFNs for selective degradation of pathogenic mitochondrial genomes bearing large-scale deletions or point mutations. *EMBO Mol. Med.* 6, 458–466.
- Gammage, P.A., Gaude, E., Van Haute, L., Rebelo-Guiomar, P., Jackson, C.B., Rorbach, J., Pekalski, M.L., Robinson, A.J., Charpentier, M., Concordet, J.-P., et al. (2016). Near-complete elimination of mutant mtDNA by iterative or dynamic dose-controlled treatment with mtZFNs. *Nucleic Acids Res.* 44, 7804–7816.

Gandre-Babbe, S., and van der Blik, A.M. (2008). The Novel Tail-anchored Membrane Protein Mff Controls Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells. *Mol. Biol. Cell* 19, 2402–2412.

Garnier, A., Fortin, D., Deloménie, C., Momken, I., Veksler, V., and Ventura-Clapier, R. (2003). Depressed mitochondrial transcription factors and oxidative capacity in rat failing cardiac and skeletal muscles. *J. Physiol.* 551, 491–501.

Gayi, E., Neff, L.A., Massana Muñoz, X., Ismail, H.M., Sierra, M., Mercier, T., Décosterd, L.A., Laporte, J., Cowling, B.S., Dorchies, O.M., et al. (2018). Tamoxifen prolongs survival and alleviates symptoms in mice with fatal X-linked myotubular myopathy. *Nat. Commun.* 9, 4848.

Gebert, N., Ryan, M.T., Pfanner, N., Wiedemann, N., and Stojanovski, D. (2011). Mitochondrial protein import machineries and lipids: A functional connection. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1808, 1002–1011.

Gibbs, E.M., Clarke, N.F., Rose, K., Oates, E.C., Webster, R., Feldman, E.L., and Dowling, J.J. (2013). Neuromuscular junction abnormalities in DNM2-related centronuclear myopathy. *J. Mol. Med. Berl. Ger.* 91, 727–737.

Giguère, V. (2008). Transcriptional control of energy homeostasis by the estrogen-related receptors. *Endocr. Rev.* 29, 677–696.

Gnaiger, E. (2009). Capacity of oxidative phosphorylation in human skeletal muscle: new perspectives of mitochondrial physiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 1837–1845.

Godin, R., Daussin, F., Matecki, S., Li, T., Petrof, B.J., and Burelle, Y. (2012). Peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1- α gene transfer restores mitochondrial biomass and improves mitochondrial calcium handling in post-necrotic mdx mouse skeletal muscle. *J. Physiol.* 590, 5487–5502.

Gomes, L.C., and Scorrano, L. (2008). High levels of Fis1, a pro-fission mitochondrial protein, trigger autophagy. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.* 1777, 860–866.

Gomes, L.C., Benedetto, G.D., and Scorrano, L. (2011). During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* 13, 589–598.

Gonorazky, H.D., Bönnemann, C.G., and Dowling, J.J. (2018). Chapter 36 - The genetics of congenital myopathies. In *Handbook of Clinical Neurology*, D.H. Geschwind, H.L. Paulson, and C. Klein, eds. (Elsevier), pp. 549–564.

González-Jamett, A.M.D., Momboisse, F.D., Haro-Acuña, V., Bevilacqua, J.A., Caviedes, P., and Cárdenas, A.M. (2013). Dynamin-2 Function and Dysfunction Along the Secretory Pathway. *Front. Endocrinol.* 4.

Gorman, G.S., Elson, J.L., Newman, J., Payne, B., McFarland, R., Newton, J.L., and Turnbull, D.M. (2015). Perceived fatigue is highly prevalent and debilitating in patients with mitochondrial disease. *Neuromuscul. Disord.* 25, 563–566.

- Gorman, G.S., Chinnery, P.F., DiMauro, S., Hirano, M., Koga, Y., McFarland, R., Suomalainen, A., Thorburn, D.R., Zeviani, M., and Turnbull, D.M. (2016). Mitochondrial diseases. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 16080.
- Grady, J.P., Campbell, G., Ratnaïke, T., Blakely, E.L., Falkous, G., Nesbitt, V., Schaefer, A.M., McNally, R.J., Gorman, G.S., Taylor, R.W., et al. (2014). Disease progression in patients with single, large-scale mitochondrial DNA deletions. *Brain* 137, 323–334.
- Gu, C., Yaddanapudi, S., Weins, A., Osborn, T., Reiser, J., Pollak, M., Hartwig, J., and Sever, S. (2010). Direct dynamin–actin interactions regulate the actin cytoskeleton. *EMBO J.* 29, 3593–3606.
- Günther-Ausborn, S., and Stegmann, T. (1997). How lysophosphatidylcholine inhibits cell-cell fusion mediated by the envelope glycoprotein of human immunodeficiency virus. *Virology* 235, 201–208.
- Guo, X., Disatnik, M.-H., Monbureau, M., Shamloo, M., Mochly-Rosen, D., and Qi, X. (2013). Inhibition of mitochondrial fragmentation diminishes Huntington’s disease–associated neurodegeneration. *J. Clin. Invest.* 123, 5371–5388.
- Ha, E.E.-J., and Frohman, M.A. (2014). Regulation of mitochondrial morphology by lipids. *BioFactors* 40, 419–424.
- Habersetzer, J., Ziani, W., Larrieu, I., Stines-Chaumeil, C., Giraud, M.-F., Brèthes, D., Dautant, A., and Paumard, P. (2013). ATP synthase oligomerization: from the enzyme models to the mitochondrial morphology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 45, 99–105.
- Handschin, C., and Spiegelman, B.M. (2006). Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 coactivators, energy homeostasis, and metabolism. *Endocr. Rev.* 27, 728–735.
- Handschin, C., Chin, S., Li, P., Liu, F., Maratos-Flier, E., Lebrasseur, N.K., Yan, Z., and Spiegelman, B.M. (2007). Skeletal muscle fiber-type switching, exercise intolerance, and myopathy in PGC-1alpha muscle-specific knock-out animals. *J. Biol. Chem.* 282, 30014–30021.
- Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2008). Principles of bioactive lipid signalling: lessons from sphingolipids. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 139–150.
- Hannun, Y.A., and Obeid, L.M. (2018). Sphingolipids and their metabolism in physiology and disease. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 175–191.
- Haque, Md.E., McIntosh, T.J., and Lentz, B.R. (2001). Influence of Lipid Composition on Physical Properties and PEG-Mediated Fusion of Curved and Uncurved Model Membrane Vesicles: “Nature’s Own” Fusogenic Lipid Bilayer. *Biochemistry* 40, 4340–4348.
- Harkewicz, R., Du, H., Tong, Z., Alkuraya, H., Bedell, M., Sun, W., Wang, X., Hsu, Y.-H., Esteve-Rudd, J., Hughes, G., et al. (2012). Essential Role of ELOVL4 Protein in Very Long Chain Fatty Acid Synthesis and Retinal Function. *J. Biol. Chem.* 287, 11469–11480.

- Harner, M., Körner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F., and Neupert, W. (2011). The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* *30*, 4356–4370.
- Harwood, J.L. (1987). [44] Phosphoglycerides of mitochondrial membranes. In *Methods in Enzymology*, (Academic Press), pp. 475–485.
- Hatch, A.L., Gurel, P.S., and Higgs, H.N. (2014). Novel roles for actin in mitochondrial fission. *J. Cell Sci.* *127*, 4549–4560.
- Hatch, A.L., Ji, W.-K., Merrill, R.A., Strack, S., and Higgs, H.N. (2016). Actin filaments as dynamic reservoirs for Drp1 recruitment. *Mol. Biol. Cell* *27*, 3109–3121.
- Henry, S.A., Kohlwein, S.D., and Carman, G.M. (2012). Metabolism and regulation of glycerolipids in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* *190*, 317–349.
- Hiltunen, J.K., Schonauer, M.S., Autio, K.J., Mittelmeier, T.M., Kastaniotis, A.J., and Dieckmann, C.L. (2009). Mitochondrial Fatty Acid Synthesis Type II: More than Just Fatty Acids. *J. Biol. Chem.* *284*, 9011–9015.
- Hnia, K., Tronchère, H., Tomczak, K.K., Amoasii, L., Schultz, P., Beggs, A.H., Payrastre, B., Mandel, J.L., and Laporte, J. (2011). Myotubularin controls desmin intermediate filament architecture and mitochondrial dynamics in human and mouse skeletal muscle. *J. Clin. Invest.* *121*, 70–85.
- Holt, I.J., Harding, A.E., and Morgan-Hughes, J.A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* *331*, 717–719.
- Hood, D.A. (2001). Invited Review: contractile activity-induced mitochondrial biogenesis in skeletal muscle. *J. Appl. Physiol. Bethesda Md* *1985* *90*, 1137–1157.
- Hoppeler, H. (1986). Exercise-Induced Ultrastructural Changes in Skeletal Muscle*. *Int. J. Sports Med.* *07*, 187–204.
- Hoppins, S., Collins, S.R., Cassidy-Stone, A., Hummel, E., DeVay, R.M., Lackner, L.L., Westermann, B., Schuldiner, M., Weissman, J.S., and Nunnari, J. (2011). A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J. Cell Biol.* *195*, 323–340.
- Horvath, S.E., and Daum, G. (2013). Lipids of mitochondria. *Prog. Lipid Res.* *52*, 590–614.
- Hovius, R., Thijssen, J., van der Linden, P., Nicolay, K., and de Kruijff, B. (1993). Phospholipid asymmetry of the outer membrane of rat liver mitochondria. Evidence for the presence of cardiolipin on the outside of the outer membrane. *FEBS Lett.* *330*, 71–76.
- Hruby, A., and Hu, F.B. (2015). The Epidemiology of Obesity: A Big Picture. *Pharmacoeconomics* *33*, 673–689.
- Huang, B., Warner, M., and Gustafsson, J.-Å. (2015). Estrogen receptors in breast carcinogenesis and endocrine therapy. *Mol. Cell. Endocrinol.* *418 Pt 3*, 240–244.

- Huang, H., Gao, Q., Peng, X., Choi, S.-Y., Sarma, K., Ren, H., Morris, A.J., and Frohman, M.A. (2011). piRNA-associated germline nuage formation and spermatogenesis require MitoPLD pro-fusogenic mitochondrial-surface lipid signaling. *Dev. Cell* 20, 376–387.
- Huss, J.M., Torra, I.P., Staels, B., Giguère, V., and Kelly, D.P. (2004). Estrogen-related receptor alpha directs peroxisome proliferator-activated receptor alpha signaling in the transcriptional control of energy metabolism in cardiac and skeletal muscle. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9079–9091.
- Hvid, L.G., Suetta, C., Aagaard, P., Kjaer, M., Frandsen, U., and Ørtenblad, N. (2013). Four days of muscle disuse impairs single fiber contractile function in young and old healthy men. *Exp. Gerontol.* 48, 154–161.
- Hyde, B.B., Twig, G., and Shirihai, O.S. (2010). Organellar vs cellular control of mitochondrial dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 575–581.
- Ikeda, M., Kanao, Y., Yamanaka, M., Sakuraba, H., Mizutani, Y., Igarashi, Y., and Kihara, A. (2008). Characterization of four mammalian 3-hydroxyacyl-CoA dehydratases involved in very long-chain fatty acid synthesis. *FEBS Lett.* 582, 2435–2440.
- Ikon, N., and Ryan, R.O. (2017). Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* 1859, 1156–1163.
- 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.
- Ishihara, N., Jofuku, A., Eura, Y., and Mihara, K. (2003). Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301, 891–898.
- 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, T., Ban-Ishihara, R., Maeda, M., Matsunaga, Y., Ichimura, A., Kyogoku, S., Aoki, H., Katada, S., Nakada, K., Nomura, M., et al. (2015). Dynamics of Mitochondrial DNA Nucleoids Regulated by Mitochondrial Fission Is Essential for Maintenance of Homogeneously Active Mitochondria during Neonatal Heart Development. *Mol. Cell. Biol.* 35, 211–223.
- Jakobsson, A., Westerberg, R., and Jakobsson, A. (2006). Fatty acid elongases in mammals: Their regulation and roles in metabolism. *Prog. Lipid Res.* 45, 237–249.
- James, D.I., Parone, P.A., Mattenberger, Y., and Martinou, J.-C. (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery.
- Jendrach, M., Mai, S., Pohl, S., Vöth, M., and Bereiter-Hahn, J. (2008). Short- and long-term alterations of mitochondrial morphology, dynamics and mtDNA after transient oxidative stress. *Mitochondrion* 8, 293–304.

- Ji, W., Hatch, A.L., Merrill, R.A., Strack, S., and Higgs, H.N. (2015). Actin filaments target the oligomeric maturation of the dynamin GTPase Drp1 to mitochondrial fission sites. *ELife* 4, e11553.
- Jin, Y., Takeda, Y., Kondo, Y., Tripathi, L.P., Kang, S., Takeshita, H., Kuhara, H., Maeda, Y., Higashiguchi, M., Miyake, K., et al. (2018). Double deletion of tetraspanins CD9 and CD81 in mice leads to a syndrome resembling accelerated aging. *Sci. Rep.* 8, 5145.
- Jungbluth, H., Treves, S., Zorzato, F., Sarkozy, A., Ochala, J., Sewry, C., Phadke, R., Gautel, M., and Muntoni, F. (2018). Congenital myopathies: disorders of excitation-contraction coupling and muscle contraction. *Nat. Rev. Neurol.* 14, 151–167.
- Kablar, B., Krastel, K., Tajbakhsh, S., and Rudnicki, M.A. (2003). Myf5 and MyoD activation define independent myogenic compartments during embryonic development. *Dev. Biol.* 258, 307–318.
- Kahle, M., Horsch, M., Fridrich, B., Seelig, A., Schultheiß, J., Leonhardt, J., Irmeler, M., Beckers, J., Rathkolb, B., Wolf, E., et al. (2013). Phenotypic comparison of common mouse strains developing high-fat diet-induced hepatosteatosis. *Mol. Metab.* 2, 435–446.
- Karaa, A., Haas, R., Goldstein, A., Vockley, J., Weaver, W.D., and Cohen, B.H. (2018). Randomized dose-escalation trial of elamipretide in adults with primary mitochondrial myopathy. *Neurology* 90, e1212–e1221.
- Karaa, A., Haas, R., Goldstein, A., Vockley, J., and Cohen, B.H. (2020). A randomized crossover trial of elamipretide in adults with primary mitochondrial myopathy. *J. Cachexia Sarcopenia Muscle*.
- Karnkowska, A., Vacek, V., Zubáčová, Z., Treitli, S.C., Petrželková, R., Eme, L., Novák, L., Žárský, V., Barlow, L.D., Herman, E.K., et al. (2016). A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle. *Curr. Biol.* 26, 1274–1284.
- Karnovsky, M.J., Kleinfeld, A.M., Hoover, R.L., and Klausner, R.D. (1982). The concept of lipid domains in membranes. *J. Cell Biol.* 94, 1–6.
- Kashatus, D.F. (2016). Restraining the Divider: A Drp1-Phospholipid Interaction Inhibits Drp1 Activity and Shifts the Balance from Mitochondrial Fission to Fusion. *Mol. Cell* 63, 913–915.
- Kassar-Duchossoy, L., Gayraud-Morel, B., Gomès, D., Rocancourt, D., Buckingham, M., Shinin, V., and Tajbakhsh, S. (2004). Mrf4 determines skeletal muscle identity in Myf5:MyoD double-mutant mice. *Nature* 431, 466–471.
- Kenniston, J.A., and Lemmon, M.A. (2010). Dynamin GTPase regulation is altered by PH domain mutations found in centronuclear myopathy patients. *EMBO J.* 29, 3054–3067.
- Khan, N.A., Auranen, M., Paetau, I., Pirinen, E., Euro, L., Forsström, S., Pasila, L., Velagapudi, V., Carroll, C.J., Auwerx, J., et al. (2014). Effective treatment of mitochondrial myopathy by nicotinamide riboside, a vitamin B3. *EMBO Mol. Med.* 6, 721–731.

- Knoll, G., and Brdiczka, D. (1983). Changes in freeze-fractured mitochondrial membranes correlated to their energetic state: Dynamic interactions of the boundary membranes. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.* *733*, 102–110.
- Koirala, S., Guo, Q., Kalia, R., Bui, H.T., Eckert, D.M., Frost, A., and Shaw, J.M. (2013). Interchangeable adaptors regulate mitochondrial dynamin assembly for membrane scission. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *110*, E1342–E1351.
- Kondadi, A.K., Anand, R., and Reichert, A.S. (2019). Functional Interplay between Cristae Biogenesis, Mitochondrial Dynamics and Mitochondrial DNA Integrity. *Int. J. Mol. Sci.* *20*.
- Korobova, F., Ramabhadran, V., and Higgs, H.N. (2013). An Actin-Dependent Step in Mitochondrial Fission Mediated by the ER-Associated Formin INF2. *Science* *339*, 464–467.
- Kramer, J.W., Hegreberg, G.A., Bryan, G.M., Meyers, K., and Ott, R.L. (1976). A muscle disorder of Labrador retrievers characterized by deficiency of type II muscle fibers. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* *169*, 817–820.
- Kramer, J.W., Hegreberg, G.A., and Hamilton, M.J. (1981). Inheritance of a neuromuscular disorder of Labrador retriever dogs. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* *179*, 380–381.
- Kraus, F., and Ryan, M.T. (2017). The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission. *J. Cell Sci.* *130*, 2953–2960.
- de Kroon, A.I., Dolis, D., Mayer, A., Lill, R., and de Kruijff, B. (1997). Phospholipid composition of highly purified mitochondrial outer membranes of rat liver and *Neurospora crassa*. Is cardiolipin present in the mitochondrial outer membrane? *Biochim. Biophys. Acta* *1325*, 108–116.
- Kuchler, K., Daum, G., and Paltauf, F. (1986). Subcellular and submitochondrial localization of phospholipid-synthesizing enzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* *165*, 901–910.
- Kuznetsov, A.V., Winkler, K., Wiedemann, F., von Bossanyi, P., Dietzmann, K., and Kunz, W.S. (1998). Impaired mitochondrial oxidative phosphorylation in skeletal muscle of the dystrophin-deficient mdx mouse. *Mol. Cell. Biochem.* *183*, 87–96.
- Lackner, L.L., Horner, J.S., and Nunnari, J. (2009). Mechanistic Analysis of a Dynamin Effector. *Science* *325*, 874–877.
- Lampf, M., Leber, A., Paltauf, F., and Daum, G. (1994). Import of phosphatidylinositol and phosphatidylcholine into mitochondria of the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *356*, 1–4.
- Lawlor, M.W., Alexander, M.S., Viola, M.G., Meng, H., Joubert, R., Gupta, V., Motohashi, N., Manfready, R.A., Hsu, C.P., Huang, P., et al. (2012). Myotubularin-deficient myoblasts display increased apoptosis, delayed proliferation, and poor cell engraftment. *Am. J. Pathol.* *181*, 961–968.
- Lee, E., Marcucci, M., Daniell, L., Pypaert, M., Weisz, O.A., Ochoa, G.-C., Farsad, K., Wenk, M.R., and Camilli, P.D. (2002). Amphiphysin 2 (Bin1) and T-Tubule Biogenesis in Muscle. *Science* *297*, 1193–1196.

- Lee, H., Smith, S.B., and Yoon, Y. (2017). The short variant of the mitochondrial dynamin OPA1 maintains mitochondrial energetics and cristae structure. *J. Biol. Chem.* *292*, 7115–7130.
- Lee, J.E., Westrate, L.M., Wu, H., Page, C., and Voeltz, G.K. (2016). Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature* *540*, 139–143.
- Lee, Y., Willers, C., Kunji, E.R.S., and Crichton, P.G. (2015). Uncoupling protein 1 binds one nucleotide per monomer and is stabilized by tightly bound cardiolipin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *112*, 6973–6978.
- Legros, F., Lombès, 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.
- Leikina, E., Melikov, K., Sanyal, S., Verma, S.K., Eun, B., Gebert, C., Pfeifer, K., Lizunov, V.A., Kozlov, M.M., and Chernomordik, L.V. (2013). Extracellular annexins and dynamin are important for sequential steps in myoblast fusion. *J. Cell Biol.* *200*, 109–123.
- Leone, T.C., Lehman, J.J., Finck, B.N., Schaeffer, P.J., Wende, A.R., Boudina, S., Courtois, M., Wozniak, D.F., Sambandam, N., Bernal-Mizrachi, C., et al. (2005). PGC-1 α Deficiency Causes Multi-System Energy Metabolic Derangements: Muscle Dysfunction, Abnormal Weight Control and Hepatic Steatosis. *PLoS Biol.* *3*.
- Lewis, S.C., Uchiyama, L.F., and Nunnari, J. (2016). ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science* *353*.
- Li, D., Gonzalez, O., Bachinski, L.L., and Roberts, R. (2000). Human protein tyrosine phosphatase-like gene: expression profile, genomic structure, and mutation analysis in families with ARVD. *Gene* *256*, 237–243.
- Liesa, M., and Shirihai, O.S. (2013). Mitochondrial Dynamics in the Regulation of Nutrient Utilization and Energy Expenditure. *Cell Metab.* *17*, 491–506.
- Liesa, M., Palacín, M., and Zorzano, A. (2009). Mitochondrial Dynamics in Mammalian Health and Disease. *Physiol. Rev.* *89*, 799–845.
- Lightowers, R.N., Taylor, R.W., and Turnbull, D.M. (2015). Mutations causing mitochondrial disease: What is new and what challenges remain? *Science* *349*, 1494–1499.
- Lionello, V.M., Nicot, A.-S., Sartori, M., Kretz, C., Kessler, P., Buono, S., Djerroud, S., Messaddeq, N., Koebel, P., Prokic, I., et al. (2019). Amphiphysin 2 modulation rescues myotubular myopathy and prevents focal adhesion defects in mice. *Sci. Transl. Med.* *11*.
- Liu, J., Dai, Q., Chen, J., Durrant, D., Freeman, A., Liu, T., Grossman, D., and Lee, R.M. (2003). Phospholipid scramblase 3 controls mitochondrial structure, function, and apoptotic response. *Mol. Cancer Res. MCR* *1*, 892–902.
- Liu, N., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Frisard, M.I., Hulver, M.W., McMillan, R.P., Wu, Y., Voelker, K.A., Grange, R.W., Richardson, J.A., et al. (2011). Mice lacking microRNA 133a develop dynamin 2–dependent centronuclear myopathy. *J. Clin. Invest.* *121*, 3258–3268.

- Losón, O.C., Song, Z., Chen, H., and Chan, D.C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* 24, 659–667.
- Lu, Y.-W., and Claypool, S.M. (2015). Disorders of phospholipid metabolism: an emerging class of mitochondrial disease due to defects in nuclear genes. *Front. Genet.* 6, 3.
- Maani, N., Sabha, N., Rezai, K., Ramani, A., Groom, L., Eltayeb, N., Mavandadnejad, F., Pang, A., Russo, G., Brudno, M., et al. (2018). Tamoxifen therapy in a murine model of myotubular myopathy. *Nat. Commun.* 9, 4849.
- Macdonald, P.J., Francy, C.A., Stepanyants, N., Lehman, L., Baglio, A., Mears, J.A., Qi, X., and Ramachandran, R. (2016). Distinct Splice Variants of Dynamin-related Protein 1 Differentially Utilize Mitochondrial Fission Factor as an Effector of Cooperative GTPase Activity. *J. Biol. Chem.* 291, 493–507.
- Mack, D.L., Poulard, K., Goddard, M.A., Latournerie, V., Snyder, J.M., Grange, R.W., Elverman, M.R., Denard, J., Veron, P., Buscara, L., et al. (2017). Systemic AAV8-Mediated Gene Therapy Drives Whole-Body Correction of Myotubular Myopathy in Dogs. *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 25, 839–854.
- Maecker, H.T., Todd, S.C., and Levy, S. (1997). The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 11, 428–442.
- Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombès, A., and Rojo, M. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep.* 6, 853–859.
- Mannella, C.A., Buttle, K., Rath, B.K., and Marko, M. (1998). Electron microscopic tomography of rat-liver mitochondria and their interaction with the endoplasmic reticulum. *BioFactors Oxf. Engl.* 8, 225–228.
- Martin, W., and Kowallik, K.V. (1999). Annotated English translation of Mereschkowsky's 1905 paper 'Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche.' *Eur. J. Phycol.* 34, 287–295.
- Martinou, J.-C., and Youle, R.J. (2006). Which came first, the cytochrome c release or the mitochondrial fission? *Cell Death Differ.* 13, 1291–1295.
- Massana Muñoz, X., Buono, S., Koebel, P., Laporte, J., and Cowling, B.S. (2019). Different in vivo impacts of dynamin 2 mutations implicated in Charcot-Marie-Tooth neuropathy or centronuclear myopathy. *Hum. Mol. Genet.* 28, 4067–4077.
- Matsuzaka, T., Shimano, H., Yahagi, N., Kato, T., Atsumi, A., Yamamoto, T., Inoue, N., Ishikawa, M., Okada, S., Ishigaki, N., et al. (2007). Crucial role of a long-chain fatty acid elongase, Elovl6, in obesity-induced insulin resistance. *Nat. Med.* 13, 1193–1202.
- Mattenberger, Y., James, D.I., and Martinou, J.C. (2003). Fusion of mitochondria in mammalian cells is dependent on the mitochondrial inner membrane potential and independent of microtubules or actin. *FEBS Lett.* 538, 53–59.
- Mattila, J.-P., Shnyrova, A.V., Sundborger, A.C., Hortelano, E.R., Fuhrmans, M., Neumann, S., Müller, M., Hinshaw, J.E., Schmid, S.L., and Frolov, V.A. (2015). A hemi-fission

intermediate links two mechanistically distinct stages of membrane fission. *Nature* 524, 109–113.

Maurer, M., Mary, J., Guillaud, L., Fender, M., Pelé, M., Bilzer, T., Olby, N., Penderis, J., Shelton, G.D., Panthier, J.-J., et al. (2012). Centronuclear myopathy in Labrador retrievers: a recent founder mutation in the PTPLA gene has rapidly disseminated worldwide. *PloS One* 7, e46408.

McGee, S.L., Howlett, K.F., Starkie, R.L., Cameron-Smith, D., Kemp, B.E., and Hargreaves, M. (2003). Exercise Increases Nuclear AMPK α 2 in Human Skeletal Muscle. *Diabetes* 52, 926–928.

McManaman, J.L., Zabaronick, W., Schaack, J., and Orlicky, D.J. (2003). Lipid droplet targeting domains of adipophilin. *J. Lipid Res.* 44, 668–673.

Mears, J.A., Lackner, L.L., Fang, S., Ingerman, E., Nunnari, J., and Hinshaw, J.E. (2011). Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18, 20–26.

Meeusen, S., McCaffery, J.M., and Nunnari, J. (2004). Mitochondrial Fusion Intermediates Revealed in Vitro. *Science* 305, 1747–1752.

Mereschkowsky, C. (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Cent.* 25, 293–604.

Millay, D.P., Goonasekera, S.A., Sargent, M.A., Maillet, M., Aronow, B.J., and Molkentin, J.D. (2009). Calcium influx is sufficient to induce muscular dystrophy through a TRPC-dependent mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 19023–19028.

Millay, D.P., O'Rourke, J.R., Sutherland, L.B., Bezprozvannaya, S., Shelton, J.M., Bassel-Duby, R., and Olson, E.N. (2013). Myomaker is a membrane activator of myoblast fusion and muscle formation. *Nature* 499, 301–305.

Mishra, P., Varuzhanyan, G., Pham, A.H., and Chan, D.C. (2015). Mitochondrial Dynamics Is a Distinguishing Feature of Skeletal Muscle Fiber Types and Regulates Organellar Compartmentalization. *Cell Metab.* 22, 1033–1044.

Mitchell, P. (1961). Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191, 144–148.

Moon, Y.-A., Hammer, R.E., and Horton, J.D. (2009). Deletion of ELOVL5 leads to fatty liver through activation of SREBP-1c in mice. *J. Lipid Res.* 50, 412–423.

Morlot, S., Galli, V., Klein, M., Chiaruttini, N., Manzi, J., Humbert, F., Dinis, L., Lenz, M., Cappello, G., and Roux, A. (2012). Membrane shape at the edge of the dynamin helix sets location and duration of the fission reaction. *Cell* 151, 619–629.

Morovat, A., Weerasinghe, G., Nesbitt, V., Hofer, M., Agnew, T., Quaghebeur, G., Sergeant, K., Fratter, C., Guha, N., Mirzazadeh, M., et al. (2017). Use of FGF-21 as a Biomarker of Mitochondrial Disease in Clinical Practice. *J. Clin. Med.* 6.

- Muhammad, E., Reish, O., Ohno, Y., Scheetz, T., DeLuca, A., Searby, C., Regev, M., Benyamini, L., Fellig, Y., Kihara, A., et al. (2013). Congenital myopathy is caused by mutation of HACD1. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 5229–5236.
- Nicot, A.-S., and Laporte, J. (2008). Endosomal Phosphoinositides and Human Diseases. *Traffic* *9*, 1240–1249.
- Nicot, A.-S., Toussaint, A., Tosch, V., Kretz, C., Wallgren-Pettersson, C., Iwarsson, E., Kingston, H., Garnier, J.-M., Biancalana, V., Oldfors, A., et al. (2007). Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat. Genet.* *39*, 1134–1139.
- Nisoli, E., Tonello, C., Cardile, A., Cozzi, V., Bracale, R., Tedesco, L., Falcone, S., Valerio, A., Cantoni, O., Clementi, E., et al. (2005). Calorie restriction promotes mitochondrial biogenesis by inducing the expression of eNOS. *Science* *310*, 314–317.
- 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.
- Osellame, L.D., Singh, A.P., Stroud, D.A., Palmer, C.S., Stojanovski, D., Ramachandran, R., and Ryan, M.T. (2016). Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission. *J. Cell Sci.* *129*, 2170–2181.
- Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., and Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* *191*, 1141–1158.
- Ou, W.J., Ito, A., Umeda, M., Inoue, K., and Omura, T. (1988). Specific binding of mitochondrial protein precursors to liposomes containing cardiolipin. *J. Biochem. (Tokyo)* *103*, 589–595.
- Owen, D. j., Wigge, P., Vallis, Y., Moore, J. d. a., Evans, P. r., and McMahon, H. t. (1998). Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J.* *17*, 5273–5285.
- Paoli, A., Bianco, A., Damiani, E., and Bosco, G. (2014). Ketogenic Diet in Neuromuscular and Neurodegenerative Diseases (Hindawi).
- Parker, M.H., Seale, P., and Rudnicki, M.A. (2003). Looking back to the embryo: defining transcriptional networks in adult myogenesis. *Nat. Rev. Genet.* *4*, 497–507.
- Parone, P.A., Cruz, S.D., 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*.
- Pelé, M., Tiret, L., Kessler, J.-L., Blot, S., and Panthier, J.-J. (2005). SINE exonic insertion in the PTPLA gene leads to multiple splicing defects and segregates with the autosomal recessive centronuclear myopathy in dogs. *Hum. Mol. Genet.* *14*, 1417–1427.

- Pelin, K., and Wallgren-Pettersson, C. (2019). Update on the Genetics of Congenital Myopathies. *Semin. Pediatr. Neurol.* 29, 12–22.
- Pernas, L., and Scorrano, L. (2016). Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function. *Annu. Rev. Physiol.* 78, 505–531.
- Perry, M.-C., Dufour, C.R., Tam, I.S., B'chir, W., and Giguère, V. (2014). Estrogen-related receptor- α coordinates transcriptional programs essential for exercise tolerance and muscle fitness. *Mol. Endocrinol. Baltim. Md* 28, 2060–2071.
- Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J.G., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* 303, 495–499.
- Pfanner, N., and Wiedemann, N. (2002). Mitochondrial protein import: two membranes, three translocases. *Curr. Opin. Cell Biol.* 14, 400–411.
- Picard, M., Wallace, D.C., and Burelle, Y. (2016). The rise of mitochondria in medicine. *Mitochondrion* 30, 105–116.
- Pilegaard, H., Ordway, G.A., Saltin, B., and Neufer, P.D. (2000). Transcriptional regulation of gene expression in human skeletal muscle during recovery from exercise. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 279, E806-814.
- Pon, L., Moll, T., Vestweber, D., Marshallsay, B., and Schatz, G. (1989). Protein import into mitochondria: ATP-dependent protein translocation activity in a submitochondrial fraction enriched in membrane contact sites and specific proteins. *J. Cell Biol.* 109, 2603–2616.
- Poste, G., and Allison, A.C. (1973). Membrane fusion. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Rev. Biomembr.* 300, 421–465.
- Prives, J., and Shinitzky, M. (1977). Increased membrane fluidity precedes fusion of muscle cells. *Nature* 268, 761–763.
- Prola, A., Blondelle, J., Vandestienne, A., Piquereau, J., Denis, R.G.P., Guyot, S., Chauvin, H., Mourier, A., Maurer, M., Henry, C., et al. (2021). Cardiolipin content controls mitochondrial coupling and energetic efficiency in muscle. *Sci. Adv.* 7, eabd6322.
- Puigserver, P., Wu, Z., Park, C.W., Graves, R., Wright, M., and Spiegelman, B.M. (1998). A Cold-Inducible Coactivator of Nuclear Receptors Linked to Adaptive Thermogenesis. *Cell* 92, 829–839.
- Qi, X., Qvit, N., Su, Y.-C., and Mochly-Rosen, D. (2013). A novel Drp1 inhibitor diminishes aberrant mitochondrial fission and neurotoxicity. *J. Cell Sci.* 126, 789–802.
- Qualmann, B., Koch, D., and Kessels, M.M. (2011). Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *EMBO J.* 30, 3501–3515.
- Quinn, M.E., Goh, Q., Kurosaka, M., Gamage, D.G., Petrany, M.J., Prasad, V., and Millay, D.P. (2017). Myomerger induces fusion of non-fusogenic cells and is required for skeletal muscle development. *Nat Commun* 8.

- Rabai, A., Reisser, L., Reina-San-Martin, B., Mamchaoui, K., Cowling, B.S., Nicot, A.-S., and Laporte, J. (2019). Allele-Specific CRISPR/Cas9 Correction of a Heterozygous DNMT2 Mutation Rescues Centronuclear Myopathy Cell Phenotypes. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *16*, 246–256.
- Rambold, A.S., Kostecky, B., Elia, N., and Lippincott-Schwartz, J. (2011). Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *108*, 10190–10195.
- Rao, P., and Monks, D.A. (2009). A tetracycline-inducible and skeletal muscle-specific Cre recombinase transgenic mouse. *Dev. Neurobiol.* *69*, 401–406.
- 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.
- Raturi, A., and Simmen, T. (2013). Where the endoplasmic reticulum and the mitochondrion tie the knot: the mitochondria-associated membrane (MAM). *Biochim. Biophys. Acta* *1833*, 213–224.
- Ravenscroft, G., Laing, N.G., and Bönnemann, C.G. (2015). Pathophysiological concepts in the congenital myopathies: blurring the boundaries, sharpening the focus. *Brain* *138*, 246–268.
- Rehmani, T., Salih, M., and Tuana, B.S. (2019). Cardiac-Specific Cre Induces Age-Dependent Dilated Cardiomyopathy (DCM) in Mice. *Molecules* *24*.
- Reid Thompson, W., Hornby, B., Manuel, R., Bradley, E., Laux, J., Carr, J., and Vernon, H.J. (2020). A phase 2/3 randomized clinical trial followed by an open-label extension to evaluate the effectiveness of elamipretide in Barth syndrome, a genetic disorder of mitochondrial cardiolipin metabolism. *Genet. Med.* 1–8.
- Relaix, F., Montarras, D., Zaffran, S., Gayraud-Morel, B., Rocancourt, D., Tajbakhsh, S., Mansouri, A., Cumanò, A., and Buckingham, M. (2006). Pax3 and Pax7 have distinct and overlapping functions in adult muscle progenitor cells. *J. Cell Biol.* *172*, 91–102.
- Reue, K. (2011). A Thematic Review Series: Lipid droplet storage and metabolism: from yeast to man. *J. Lipid Res.* *52*, 1865–1868.
- Ricquier, D., and Bouillaud, F. (2000). The uncoupling protein homologues: UCP1, UCP2, UCP3, StUCP and AtUCP. *Biochem. J.* *345*, 161–179.
- Ricquier, D., and Kader, J.C. (1976). Mitochondrial protein alteration in active brown fat: a sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoretic study. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *73*, 577–583.
- Rinnenthal, J.L., Dittmayer, C., Irlbacher, K., Wacker, I., Schröder, R., Goebel, H.-H., Butori, C., Villa, L., Sacconi, S., and Stenzel, W. (2018). New variant of necklace fibres display peculiar lysosomal structures and mitophagy. *Neuromuscul. Disord.* *28*, 846–856.
- Romero, N.B., and Bitoun, M. (2011). Centronuclear Myopathies. *Semin. Pediatr. Neurol.* *18*, 250–256.

- Rosivatz, E., and Woscholski, R. (2011). Removal or masking of phosphatidylinositol(4,5)bisphosphate from the outer mitochondrial membrane causes mitochondrial fragmentation. *Cell. Signal.* *23*, 478–486.
- Rossignol, 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.
- Royer, B., Hnia, K., Gavriilidis, C., Tronchère, H., Tosch, V., and Laporte, J. (2013). The myotubularin–amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO Rep.* *14*, 907–915.
- Rusiñol, A.E., Cui, Z., Chen, M.H., and Vance, J.E. (1994). A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J. Biol. Chem.* *269*, 27494–27502.
- Rybalka, E., Timpani, C.A., Cooke, M.B., Williams, A.D., and Hayes, A. (2014). Defects in Mitochondrial ATP Synthesis in Dystrophin-Deficient Mdx Skeletal Muscles May Be Caused by Complex I Insufficiency. *PLOS ONE* *9*, e115763.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J. Theor. Biol.* *14*, 225-IN6.
- Sauvanet, C., Duvezin-Caubet, S., di Rago, J.-P., and Rojo, M. (2010). Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* *21*, 558–565.
- Schafer, D.A. (2004). Regulating Actin Dynamics at Membranes: A Focus on Dynamin. *Traffic* *5*, 463–469.
- 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.
- Schlame, M., Horvath, L., and Vigh, L. (1990). Relationship between lipid saturation and lipid-protein interaction in liver mitochondria modified by catalytic hydrogenation with reference to cardiolipin molecular species. *Biochem. J.* *265*, 79–85.
- Schneider, R., BRÜGGER, B., Amann, C.M., Prestwich, G.D., Epan, R.F., Zellnig, G., Wieland, F.T., and Epan, R.M. (2004). Identification and biophysical characterization of a very-long-chain-fatty-acid-substituted phosphatidylinositol in yeast subcellular membranes. *Biochem. J.* *381*, 941–949.
- Schuldiner, M., Collins, S.R., Thompson, N.J., Denic, V., Bhamidipati, A., Punna, T., Ihmels, J., Andrews, B., Boone, C., Greenblatt, J.F., et al. (2005). Exploration of the Function and Organization of the Yeast Early Secretory Pathway through an Epistatic Miniarray Profile. *Cell* *123*, 507–519.
- Serricchio, M., and Bütikofer, P. (2013). Phosphatidylglycerophosphate synthase associates with a mitochondrial inner membrane complex and is essential for growth of *Trypanosoma brucei*. *Mol. Microbiol.* *87*, 569–579.

- Sheridan, C., Delivani, P., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Bax- or Bak-Induced Mitochondrial Fission Can Be Uncoupled from Cytochrome c Release. *Mol. Cell* *31*, 570–585.
- Shiao, Y.J., Balcerzak, B., and Vance, J.E. (1998). A mitochondrial membrane protein is required for translocation of phosphatidylserine from mitochondria-associated membranes to mitochondria. *Biochem. J.* *331* (Pt 1), 217–223.
- Siegel, M.P., Kruse, S.E., Percival, J.M., Goh, J., White, C.C., Hopkins, H.C., Kavanagh, T.J., Szeto, H.H., Rabinovitch, P.S., and Marcinek, D.J. (2013). Mitochondrial-targeted peptide rapidly improves mitochondrial energetics and skeletal muscle performance in aged mice. *Aging Cell* *12*, 763–771.
- Simbeni, R., Pon, L., Zinser, E., Paltauf, F., and Daum, G. (1991). Mitochondrial membrane contact sites of yeast. Characterization of lipid components and possible involvement in intramitochondrial translocation of phospholipids. *J. Biol. Chem.* *266*, 10047–10049.
- Singh, K., and Hood, D.A. (2010). Effect of denervation-induced muscle disuse on mitochondrial protein import. *Am. J. Physiol.-Cell Physiol.* *300*, C138–C145.
- Siu, P.M., Pistilli, E.E., and Alway, S.E. (2005). Apoptotic responses to hindlimb suspension in gastrocnemius muscles from young adult and aged rats. *Am. J. Physiol.-Regul. Integr. Comp. Physiol.* *289*, R1015–R1026.
- Skulachev, V.P. (2001). Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem. Sci.* *26*, 23–29.
- 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.
- Smith, S. (1994). The animal fatty acid synthase: one gene, one polypeptide, seven enzymes. *FASEB J.* *8*, 1248–1259.
- 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.
- Soubannier, V., and McBride, H.M. (2009). Positioning mitochondrial plasticity within cellular signaling cascades. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 154–170.
- Spiro, A.J., Shy, G.M., and Gonatas, N.K. (1966). Myotubular myopathy. Persistence of fetal muscle in an adolescent boy. *Arch. Neurol.* *14*, 1–14.
- Sundborger, A.C., Fang, S., Heymann, J.A., Ray, P., Chappie, J.S., and Hinshaw, J.E. (2014). A dynamin mutant defines a super-constricted pre-fission state. *Cell Rep.* *8*, 734–742.
- Szeto, H.H., and Birk, A.V. (2014). Serendipity and the discovery of novel compounds that restore mitochondrial plasticity. *Clin. Pharmacol. Ther.* *96*, 672–683.

Tachibana, I., and Hemler, M.E. (1999). Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. *J. Cell Biol.* *146*, 893–904.

TAINTER, M.L., STOCKTON, A.B., and CUTTING, W.C. (1933). USE OF DINITROPHENOL IN OBESITY AND RELATED CONDITIONS: A PROGRESS REPORT. *J. Am. Med. Assoc.* *101*, 1472–1475.

Takahashi, M., and Hood, D.A. (1996). Protein Import into Subsarcolemmal and Intermembranular Skeletal Muscle Mitochondria DIFFERENTIAL IMPORT REGULATION IN DISTINCT SUBCELLULAR REGIONS. *J. Biol. Chem.* *271*, 27285–27291.

Takeda, Y., Tachibana, I., Miyado, K., Kobayashi, M., Miyazaki, T., Funakoshi, T., Kimura, H., Yamane, H., Saito, Y., Goto, H., et al. (2003). Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *J. Cell Biol.* *161*, 945–956.

Tasfaout, H., Buono, S., Guo, S., Kretz, C., Messaddeq, N., Booten, S., Greenlee, S., Monia, B.P., Cowling, B.S., and Laporte, J. (2017). Antisense oligonucleotide-mediated Dnm2 knockdown prevents and reverts myotubular myopathy in mice. *Nat. Commun.* *8*, 1–13.

Tasfaout, H., Cowling, B.S., and Laporte, J. (2018). Centronuclear myopathies under attack: A plethora of therapeutic targets. *J. Neuromuscul. Dis.* *5*, 387–406.

Timpani, C.A., Hayes, A., and Rybalka, E. (2015). Revisiting the dystrophin-ATP connection: How half a century of research still implicates mitochondrial dysfunction in Duchenne Muscular Dystrophy aetiology. *Med. Hypotheses* *85*, 1021–1033.

Tinelli, E., Pereira, J.A., and Suter, U. (2013). Muscle-specific function of the centronuclear myopathy and Charcot-Marie-Tooth neuropathy-associated dynamin 2 is required for proper lipid metabolism, mitochondria, muscle fibers, neuromuscular junctions and peripheral nerves. *Hum. Mol. Genet.* *22*, 4417–4429.

Tiret, L., Blot, S., Kessler, J.-L., Gaillot, H., Breen, M., and Panthier, J.-J. (2003). The *cnm* locus, a canine homologue of human autosomal forms of centronuclear myopathy, maps to chromosome 2. *Hum. Genet.* *113*, 297–306.

Toscano, A., Emmanuele, V., Savarese, M., Musumeci, O., Torella, A., Conca, E., Moggio, M., Nigro, V., and Rodolico, C. (2017). Pseudo-dominant inheritance of a novel homozygous *HACD1* mutation associated with congenital myopathy: The first caucasian family. *Neuromuscul. Disord.* *27*, S173.

Toussaint, A., Cowling, B.S., Hnia, K., Mohr, M., Oldfors, A., Schwab, Y., Yis, U., Maisonobe, T., Stojkovic, T., Wallgren-Pettersson, C., et al. (2011). Defects in amphiphysin 2 (*BIN1*) and triads in several forms of centronuclear myopathies. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *121*, 253–266.

Trochet, D., Prudhon, B., Beuvin, M., Peccate, C., Lorain, S., Julien, L., Benkhelifa-Ziyyat, S., Rabai, A., Mamchaoui, K., Ferry, A., et al. (2018). Allele-specific silencing therapy for Dynamin 2-related dominant centronuclear myopathy. *EMBO Mol. Med.* *10*, 239–253.

- Twig, G., Elorza, A., Molina, A.J.A., Mohamed, H., Wikstrom, J.D., Walzer, G., Stiles, L., Haigh, S.E., Katz, S., Las, G., et al. (2008). Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* *27*, 433–446.
- Uwanogho, D.A., Hardcastle, Z., Balogh, P., Mirza, G., Thornburg, K.L., Ragoussis, J., and Sharpe, P.T. (1999). Molecular cloning, chromosomal mapping, and developmental expression of a novel protein tyrosine phosphatase-like gene. *Genomics* *62*, 406–416.
- Vance, J.E. (1990). Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* *265*, 7248–7256.
- Vance, J.E. (1991). Newly made phosphatidylserine and phosphatidylethanolamine are preferentially translocated between rat liver mitochondria and endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* *266*, 89–97.
- Vance, J.E., and Vance, D.E. (2004). Phospholipid biosynthesis in mammalian cells. *Biochem. Cell Biol. Biochim. Biol. Cell.* *82*, 113–128.
- Vila, M.C., Rayavarapu, S., Hogarth, M.W., Van der Meulen, J.H., Horn, A., Defour, A., Takeda, S., Brown, K.J., Hathout, Y., Nagaraju, K., et al. (2017). Mitochondria mediate cell membrane repair and contribute to Duchenne muscular dystrophy. *Cell Death Differ.* *24*, 330–342.
- Voelker, D.R. (2005). Bridging gaps in phospholipid transport. *Trends Biochem. Sci.* *30*, 396–404.
- Volpi, L., Ricci, G., Orsucci, D., Alessi, R., Bertolucci, F., Piazza, S., Simoncini, C., Mancuso, M., and Siciliano, G. (2011). Metabolic myopathies: functional evaluation by different exercise testing approaches. *Musculoskelet. Surg.* *95*, 59–67.
- Wai, T., and Langer, T. (2016). Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol. Metab. TEM* *27*, 105–117.
- Wall, B.T., Dirks, M.L., and van Loon, L.J.C. (2013). Skeletal muscle atrophy during short-term disuse: implications for age-related sarcopenia. *Ageing Res. Rev.* *12*, 898–906.
- Wallace, D.C., and Chalkia, D. (2013). Mitochondrial DNA Genetics and the Heteroplasmy Conundrum in Evolution and Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*, a021220.
- Wallace, D.C., Zheng, X.X., Lott, M.T., Shoffner, J.M., Hodge, J.A., Kelley, R.I., Epstein, C.M., and Hopkins, L.C. (1988). Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* *55*, 601–610.
- Wallberg, A.E., Yamamura, S., Malik, S., Spiegelman, B.M., and Roeder, R.G. (2003). Coordination of p300-Mediated Chromatin Remodeling and TRAP/Mediator Function through Coactivator PGC-1 α . *Mol. Cell* *12*, 1137–1149.
- Walmsley, G.L., Blot, S., Venner, K., Sewry, C., Laporte, J., Blondelle, J., Barthélémy, I., Maurer, M., Blanchard-Gutton, N., Pilot-Storck, F., et al. (2017). Progressive Structural Defects in Canine Centronuclear Myopathy Indicate a Role for HACD1 in Maintaining Skeletal Muscle Membrane Systems. *Am. J. Pathol.* *187*, 441–456.

- Walther, T.C., and Farese, R.V. (2012). Lipid Droplets and Cellular Lipid Metabolism. *Annu. Rev. Biochem.* *81*, 687–714.
- Wanagat, J., Cao, Z., Pathare, P., and Aiken, J.M. (2001). Mitochondrial DNA deletion mutations colocalize with segmental electron transport system abnormalities, muscle fiber atrophy, fiber splitting, and oxidative damage in sarcopenia. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *15*, 322–332.
- Wang, B., Pelletier, J., Massaad, M.J., Herscovics, A., and Shore, G.C. (2004). The yeast split-ubiquitin membrane protein two-hybrid screen identifies BAP31 as a regulator of the turnover of endoplasmic reticulum-associated protein tyrosine phosphatase-like B. *Mol. Cell. Biol.* *24*, 2767–2778.
- Wang, L., Barylko, B., Byers, C., Ross, J.A., Jameson, D.M., and Albanesi, J.P. (2010). Dynamin 2 Mutants Linked to Centronuclear Myopathies Form Abnormally Stable Polymers. *J. Biol. Chem.* *285*, 22753–22757.
- Wang, W., Yin, J., Ma, X., Zhao, F., Siedlak, S.L., Wang, Z., Torres, S., Fujioka, H., Xu, Y., Perry, G., et al. (2017). Inhibition of mitochondrial fragmentation protects against Alzheimer’s disease in rodent model. *Hum. Mol. Genet.* *26*, 4118–4131.
- Wechsler-Reya, R., Sakamuro, D., Zhang, J., Duhadaway, J., and Prendergast, G.C. (1997). Structural Analysis of the Human BIN1 Gene EVIDENCE FOR TISSUE-SPECIFIC TRANSCRIPTIONAL REGULATION AND ALTERNATE RNA SPLICING. *J. Biol. Chem.* *272*, 31453–31458.
- Wechsler-Reya, R.J., Elliott, K.J., and Prendergast, G.C. (1998). A Role for the Putative Tumor Suppressor Bin1 in Muscle Cell Differentiation. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 566–575.
- Westerberg, R., Tvrdik, P., Undén, A.-B., Månsson, J.-E., Norlén, L., Jakobsson, A., Holleran, W.H., Elias, P.M., Asadi, A., Flodby, P., et al. (2004). Role for ELOVL3 and fatty acid chain length in development of hair and skin function. *J. Biol. Chem.* *279*, 5621–5629.
- Wu, Z., Puigserver, P., Andersson, U., Zhang, C., Adelmant, G., Mootha, V., Troy, A., Cinti, S., Lowell, B., Scarpulla, R.C., et al. (1999). Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1. *Cell* *98*, 115–124.
- Yatsuga, S., and Suomalainen, A. (2012). Effect of bezafibrate treatment on late-onset mitochondrial myopathy in mice. *Hum. Mol. Genet.* *21*, 526–535.
- Yatsuga, S., Fujita, Y., Ishii, A., Fukumoto, Y., Arahata, H., Kakuma, T., Kojima, T., Ito, M., Tanaka, M., Saiki, R., et al. (2015). Growth differentiation factor 15 as a useful biomarker for mitochondrial disorders. *Ann. Neurol.* *78*, 814–823.
- 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 J. Neurol.* *131*, 352–367.
- Zhang, R., Wang, Y., Ye, K., Picard, M., and Gu, Z. (2017). Independent impacts of aging on mitochondrial DNA quantity and quality in humans. *BMC Genomics* *18*.

Zhang, Y., Liu, X., Bai, J., Tian, X., Zhao, X., Liu, W., Duan, X., Shang, W., Fan, H.-Y., and Tong, C. (2016). Mitoguardin Regulates Mitochondrial Fusion through MitoPLD and Is Required for Neuronal Homeostasis. *Mol. Cell* *61*, 111–124.

Zhang, Q., Vashisht, A.A., O'Rourke, J., Corbel, S.Y., Moran, R., Romero, A., Miraglia, L., Zhang, J., Durrant, E., Schmedt, C., et al. (2017). The microprotein Minion controls cell fusion and muscle formation. *Nat Commun* *8*.

Zhao, M., Maani, N., and Dowling, J.J. (2018). Dynamin 2 (DNM2) as Cause of, and Modifier for, Human Neuromuscular Disease. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* *15*, 966–975.

Zhou, H., Wang, S., Zhu, P., Hu, S., Chen, Y., and Ren, J. (2018). Empagliflozin rescues diabetic myocardial microvascular injury via AMPK-mediated inhibition of mitochondrial fission. *Redox Biol.* *15*, 335–346.

Zoll, J., Monassier, L., Garnier, A., N'Guessan, B., Mettauer, B., Veksler, V., Piquard, F., Ventura-Clapier, R., and Geny, B. (2006). ACE inhibition prevents myocardial infarction-induced skeletal muscle mitochondrial dysfunction. *J. Appl. Physiol.* *101*, 385–391.

Züchner, S., Noureddine, M., Kennerson, M., Verhoeven, K., Claeys, K., De Jonghe, P., Merory, J., Oliveira, S.A., Speer, M.C., Stenger, J.E., et al. (2005). Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat. Genet.* *37*, 289–294.