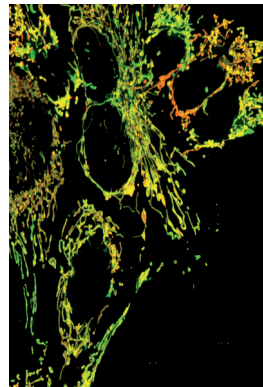


> De multiples altérations peuvent affecter le génome mitochondrial et entraîner l'apparition de nombreuses maladies, pour la plupart neuromusculaires. Bien qu'à ce jour il n'existe aucun traitement efficace pour de telles affections, diverses stratégies sont envisagées. Nous décrivons ici les principales affections liées à une altération de l'ADN mitochondrial (ADNmt), les systèmes expérimentaux utilisés pour étudier les mécanismes moléculaires de ces dysfonctionnements (levures, cellules cybrides, souris, etc.) et faisons un tour d'horizon des progrès récents dans le développement de différentes approches thérapeutiques. <

Caractérisées par un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire au niveau d'un ou plusieurs complexes enzymatiques qui la composent, les maladies mitochondriales regroupent une pléiade d'affections, pour la plupart des myopathies ou des maladies neurodégénératives (Tableau 1). De par la double dépendance génétique des mitochondries (génomés nucléaire et mitochondrial), l'émergence de ces maladies peut être consécutive à l'apparition de mutations affectant l'un des gènes détenus par l'ADN nucléaire ou l'un des 37 gènes portés par l'ADN mitochondrial (ADNmt). En effet, on estime qu'environ 1 500 gènes nucléaires codent pour le protéome mitochondrial, dont près de 200 sont impliqués dans l'apparition de maladies mitochondriales lorsqu'ils sont mutés [1]. Face à cela, plus de 270 mutations pathogènes altèrent directement l'ADNmt. Ces mutations, responsables de maladies dites pathologies de l'ADN mitochondrial, sont le sujet de cette revue. La majorité d'entre elles sont dites hétéroplasmiques, signifiant que l'ADNmt peut coexister sous deux formes - sauvage et mutée - au sein d'une même cellule, et que l'apparition et la sévérité des maladies mitochondriales dépendront alors de ce taux d'hétéroplasmie (Figure 1). Agir sur le génome mitochondrial serait donc un moyen de traiter bon nombre de maladies, mais constitue un défi majeur compte tenu de la difficulté à introduire des acides

Pathologies de l'ADN mitochondrial et stratégies thérapeutiques

Yann Tonin, Nina Entelis



UMR 7156,
Université de Strasbourg-CNRS,
21, rue René Descartes,
67084 Strasbourg, France.
n.entelis@unistra.fr

nucléiques au sein des mitochondries et à cibler spécifiquement l'ADNmt mutant. Néanmoins, des progrès considérables ont été effectués ces dernières années dans la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine de ces maladies, et ont mené au développement de nombreuses stratégies thérapeutiques actuellement explorées dans les laboratoires.

Modèles d'études des maladies mitochondriales

La levure : un modèle d'étude des maladies mitochondriales

La levure fait partie des modèles les plus courants d'étude des maladies mitochondriales et, plus particulièrement, de modélisation de mutations dans les gènes des ARNt. Il est en effet possible d'y introduire de l'ADN étranger par transformation biolistique et ainsi de manipuler son génome mitochondrial. Le fait que certaines levures, et en particulier *Saccharomyces cerevisiae*, la plus étudiée, soient capables de survivre en l'absence de mitochondries fonctionnelles, via la fermentation, les rend d'autant plus adaptées à l'étude des pathologies les plus sévères associées à un déficit respiratoire mitochondrial profond [2, 3] (→). Ainsi, la levure a permis d'étudier les effets biochimiques de mutations du gène codant pour l'ATPase 6 [4], et d'identifier des suppresseurs de mutations des ARNt, tels EF-Tu (*elongation factor thermo unstable*), ou des aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales [5]. Mais même si la levure semble un atout majeur dans la compréhension des mécanismes pathologiques mitochondriaux, elle possède tout de même ses limites, car cet organisme unicellulaire ne possède pas de tissus différenciés. Il est également impossible d'étudier le complexe I de la chaîne respiratoire, la plupart des levures en étant dépourvues.

(→) Voir la Synthèse de C. Voisset et M. Blondel, page 1161 de ce numéro

Affection	Caractéristiques	Principaux symptômes et signes cliniques	Apparition	Prévalence
MELAS	<i>Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes</i> Désordre multisystémique (cerveau, muscles et système endocrinien) le plus courant > 12 mutations associées à ce syndrome, la plus courante étant la mutation ponctuelle A3243G affectant le gène codant l'ARNt leucine	Hémiplariés à rechutes dues à des accidents vasculaires cérébraux pseudo-ischémiques, cardiomyopathie, surdité, diabète, etc.	Enfance	Inconnue
MERRF	<i>Myoclonus epilepsy and ragged red fibres</i> Essentiellement mutations de l'ARNt ^{lys} (A8344G dans 80 % des cas) qui altèrent l'efficacité de la traduction ; tableau clinique variable, présence de fibres rouges décolorées dans le muscle lui donnant son nom	Épilepsie myoclonique, surdité, atrophie optique, myopathie, etc.	Enfance	1-9/1 000 000
NARP/MILS	Neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire/ <i>maternally inherited Leigh's syndrome</i> Associé à des mutations de l'ATPase 6 ; syndrome cliniquement hétérogène : neuropathie périphérique, ataxie cérébelleuse et cécité nocturne ; le syndrome MILS est le phénotype le plus sévère du syndrome NARP (> 90 % hétéroplasmie)	Cécité, retard de développement, démence, perte auditive, épilepsie, etc.	Enfance	1-9/100 000
LHON	<i>Leber's hereditary optic neuropathy</i> Désordre le plus courant relié à l'ADNmt (complexes I et III) ; perte de la vision due à une perte des cellules ganglionnaires de la rétine et de leurs axones qui composent le nerf optique. Se transmet selon un mode maternel	Perte brutale et sévère de la vision centrale (unilatérale puis bilatérale), papille atrophique au fond d'œil, etc.	Adolescence/jeune âge adulte	1/50 000
Syndrome de Leigh	Mutations nucléaires et de l'ADNmt ; affecte essentiellement le complexe I ou les facteurs d'assemblage du complexe IV	Défaillance polyviscérale néonatale, retard de développement staturonodéral, hypotonie, ataxie, épilepsie, atrophie optique, etc.	Néonatal/jeune âge adulte (forme <i>Leigh-like</i>)	< 1/1 000 000
KSS	Kearns Sayre syndrome ; début < 20 ans ; maladie neuromusculaire multisystémique ; larges délétions sporadiques dans l'ADNmt	Ophtalmoplégie, ptosis, surdité, cardiomyopathie, ataxie, insuffisance rénale, etc.	Enfance	1-9/100 000
CPEO	<i>Chronic progressive external ophthalmoplegia</i> Affection due à de larges délétions de l'ADNmt ; faiblesse progressive des muscles des globes oculaires ; début à l'âge adulte ; symptômes associés très divers	Ophtalmoplégie, surdité, diabète, insuffisance rénale, troubles de conduction cardiaque, etc.	Adolescence/jeune âge adulte	Inconnue
Syndrome de Pearson	Décrit chez ~ 60 cas ; anémie sidéroblastique réfractaire avec insuffisance pancréatique exocrine ; généralement sporadique et consécutif à de larges délétions	Anémie réfractaire, pancytopenie, dénutrition par malabsorption intestinale, insuffisances rénale et hépatique, diarrhée, troubles neuro-musculaires, etc.	Néonatal/petite enfance	< 1/1 000 000

Tableau 1. Principales pathologies dues à des mutations de l'ADNmt. Les données présentées sont issues de la base de données Orphanet (www.orpha.net).

Modèles cellulaires humains de mutations de l'ADNmt

Faciles à obtenir chez le patient et à cultiver *in vitro*, les fibroblastes primaires représentent un important modèle pour l'étude des conséquences d'une mutation sur la structure et les fonctions mitochondriales. Ils ne peuvent pas être cultivés longtemps, mais servent de base pour générer des lignées cellulaires *trans*-mitochondriales.

Initialement décrites en 1989 [7], les cellules « cybrides » résultent de la fusion de cytoplastes énucléés de patients porteurs d'une mutation de leur génome mitochondrial et de cellules immortalisées débarrassées de leur ADNmt (Figure 2A). Tout en permettant d'identifier l'origine nucléaire ou mitochondriale d'un déficit de la chaîne respiratoire, ces cellules sont très utilisées pour comprendre les conséquences des mutations de l'ADNmt en fournissant un environnement génétique nucléaire contrôlé. Si elles semblent être l'outil idéal, certaines précautions doivent être prises. En effet, la plupart des cybrides étant issus de cellules tumorales aneuploïdes, ils utilisent de façon très préférentielle la glycolyse pour assurer leurs besoins énergétiques et ne dépendent que très peu, voire pas du tout, de la production énergétique mitochondriale [8].

Depuis 2007 et la découverte de S. Yamanaka, les fibroblastes peuvent également être reprogrammés en cellules souches pluripotentes (iPS, *induced pluripotent stem cells*) – qui possèdent toutes les caractéristiques des cellules souches embryonnaires – permettant d'étudier les effets des mutations de l'ADNmt dans des cellules humaines différenciées [6]. Elles sont en effet capables de se différencier dans tous les types cellulaires et de se multiplier à l'infini. De plus, les iPS, lorsqu'elles proviennent de la reprogrammation de fibroblastes prélevés chez les patients, permettent de modéliser des pathologies variées tout en contournant les problèmes éthiques soulevés par l'utilisation de cellules souches embryonnaires. Toutefois, le développement très récent de ces cellules ne permet pas d'avoir le recul nécessaire sur ce modèle. Il est par exemple possible que le processus de reprogrammation entraîne l'apparition de nouvelles mutations [9].

Modèle murin des mutations affectant l'ADNmt

Incontournable au regard d'aspects thérapeutiques plus appliqués, un modèle murin permet de mieux comprendre la genèse des pathologies et de tester des stratégies thérapeutiques. Mais, si de nombreux modèles ont pu être développés pour des mutations nucléaires, ceci n'est pas le cas pour des mutations affectant l'ADNmt qui ne peut pas être manipulé comme l'ADN nucléaire. Le premier modèle fut développé il y a une quinzaine d'années : des cytoplastes d'ovules de souris furent micro-injectés dans les ovules d'une souris présentant un autre génotype mitochondrial. Ceci conduisit à l'obtention d'une lignée de souris porteuses des deux génomes mitochondriaux différant par une série de polymorphismes [10]. Ces souris hétéroplasmiques, bien qu'elles ne présentent aucun symptôme, furent très utiles pour étudier les processus de ségrégation de l'hétéroplasmie au travers des générations, mais aussi entre tissus, au cours de la vie de l'animal.

Un second modèle est celui des *mito-mice*, plus directement pertinent pour l'étude des maladies mitochondriales. Il utilise la même approche d'injection de cytoplasme avec mitochondries dans l'ovule (Figure 2B). Ces *mito-mice*, dont la durée de vie n'excède pas quelques mois,

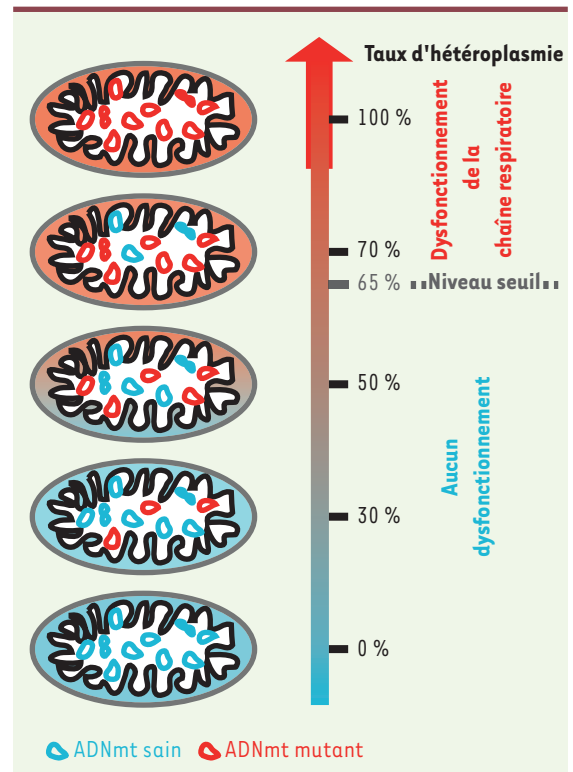


Figure 1. Principe de l'hétéroplasmie. L'ADNmt est présent en plusieurs centaines d'exemplaires au sein des mitochondries d'une même cellule. Si une mutation apparaît, les ADNmt sain (en bleu) et muté (en rouge) peuvent coexister sans qu'aucun trouble ne se manifeste. Mais, au-delà d'une certaine proportion de molécules d'ADNmt muté, des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire vont apparaître. Cette proportion de molécules est variable en fonction du tissu atteint, du type de mutation et de l'âge du patient, et se situe en moyenne autour de 65 %.

arborent une large délétion de l'ADNmt ($\Delta 7759-12454$) associée à de multiples symptômes (myopathie, défaillance rénale, anémie, surdité, etc.) et se caractérisent par une augmentation progressive du taux d'hétéroplasmie [11]. Enfin, on peut également citer des souris porteuses de mutations de gènes nucléaires assurant la maintenance et la réplication de l'ADNmt, et qui accumulent des défauts au sein de leur génome mitochondrial. Ainsi, les conséquences de mutations affectant la polymérase γ [12], l'hélicase Twinkle [13] ou le facteur TFAM (*mitochondrial transcription factor A*) [14] ont pu être étudiées plus en détails.

Stratégies thérapeutiques contre les maladies mitochondriales

Prévention de la transmission des maladies génétiques

Selon le célèbre adage « mieux vaut prévenir que guérir », une solution pour éviter l'apparition d'une

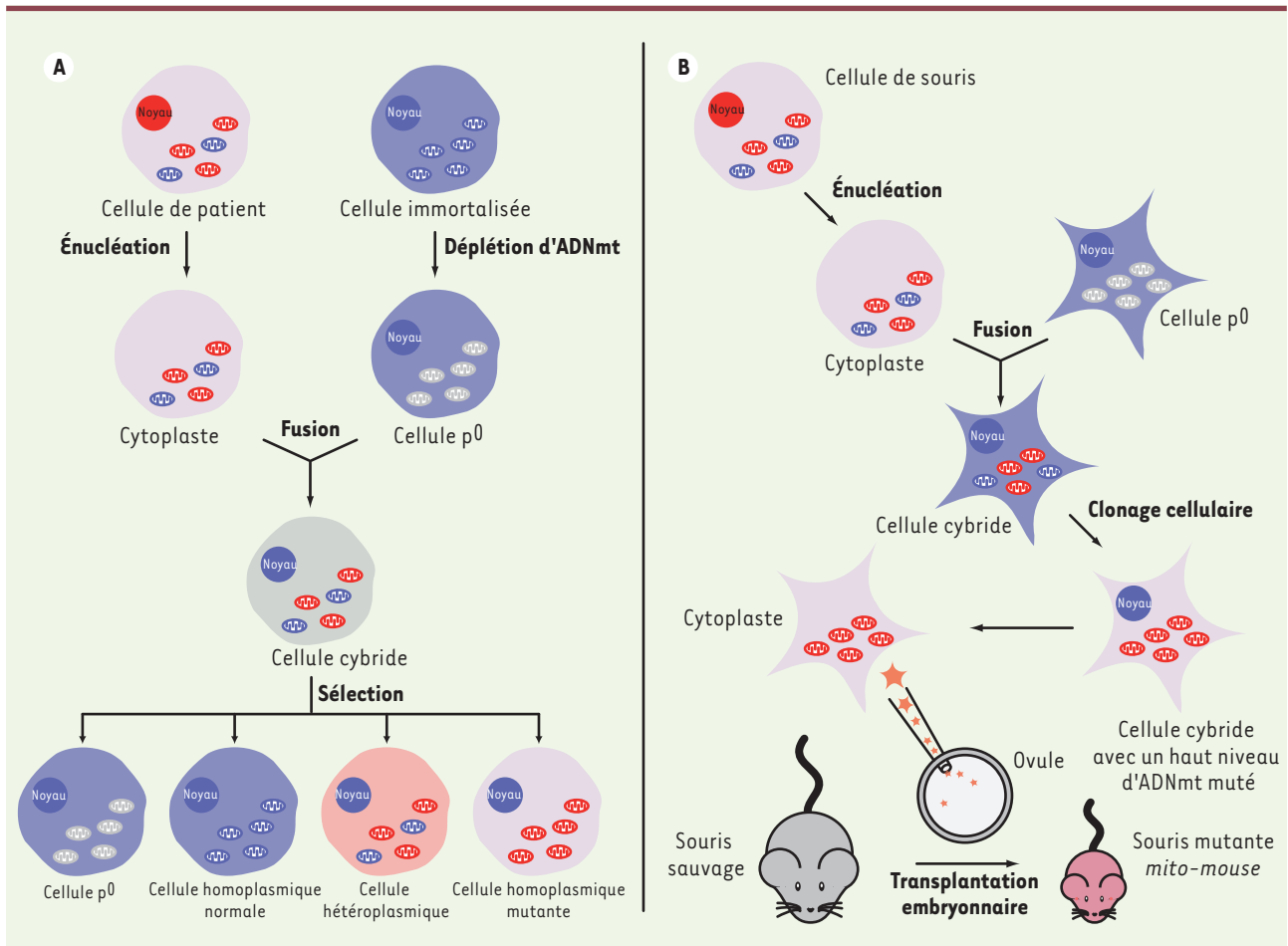


Figure 2. Génération de cellules cybrides et création de mito-mice. **A.** Cellules cybrides. Les cellules cybrides sont issues de la fusion de cytoplastes énucléés de patients malades et de cellules rho-0 immortalisées. Les mitochondries ayant un contenu riche en ADNmt sauvage sont représentées en bleu, celles porteuses d'ADNmt muté en rouge et celles dont l'ADNmt a été délété en gris. Après fusion, les cellules, pour la plupart hétéroplasmiques, sont sélectionnées. **B.** Mito-mice. Comme pour les cellules cybrides, cytoplastes et cellules rho-0 murines sont fusionnées. Après enrichissement en ADNmt muté et énucléation des cellules cybrides, les cytoplastes obtenus sont intégrés dans un embryon qui sera transplante dans une souris porteuse (en gris). La descendance issue de cette manipulation (en rouge) arbore alors un phénotype mutant.

maladie due à une mutation de l'ADNmt serait de détecter la présence de cette mutation avant la naissance de l'enfant et, le cas échéant, d'en enrayer la transmission en substituant le génome mitochondrial muté par un génome sain.

Pour ce faire, les médecins disposent de différentes méthodes : diagnostic prénatal, diagnostic préimplantatoire, transfert cytoplasmique et transfert pronucléaire.

- Dans le cas d'une procédure de procréation médicalement assistée pour une maladie mitochondriale, les méthodes de diagnostic prénatal permettent d'évaluer le taux d'hétéroplasmie des cellules embryonnaires et fœtales et, ainsi, d'estimer le risque potentiel d'expression de la maladie chez l'enfant. Le diagnostic préimplantatoire permet, quant à lui, de mesurer le taux d'hétéroplasmie sur une ou deux cellules d'un embryon conçu *in vitro* afin de ne transférer que les embryons possédant de très faibles taux d'ADNmt mutant. Dans ce second cas de figure, la présence d'une mutation serait

détectée avant même l'implantation de l'embryon et il serait alors plus facile d'organiser, selon la gravité de la maladie, une surveillance du développement du fœtus pendant la grossesse ou de mettre en œuvre les moyens médicaux adaptés.

- Concernant le transfert cytoplasmique et le transfert pronucléaire [15], la première approche initialement utilisée pour augmenter les chances de développement embryonnaire en présence d'une mutation de l'ADNmt consiste à diluer cet ADNmt muté de l'ovocyte en y transférant de l'ovoplasme (autrement dit du cytoplasme ovocytaire) de donneuses saines ; mais la proportion de matériel ajouté ne peut alors dépasser le tiers du contenu total en ADNmt. Cette limitation explique l'existence d'une hétéroplasmie chez les nouveau-nés [16]. Une seconde approche - par transfert

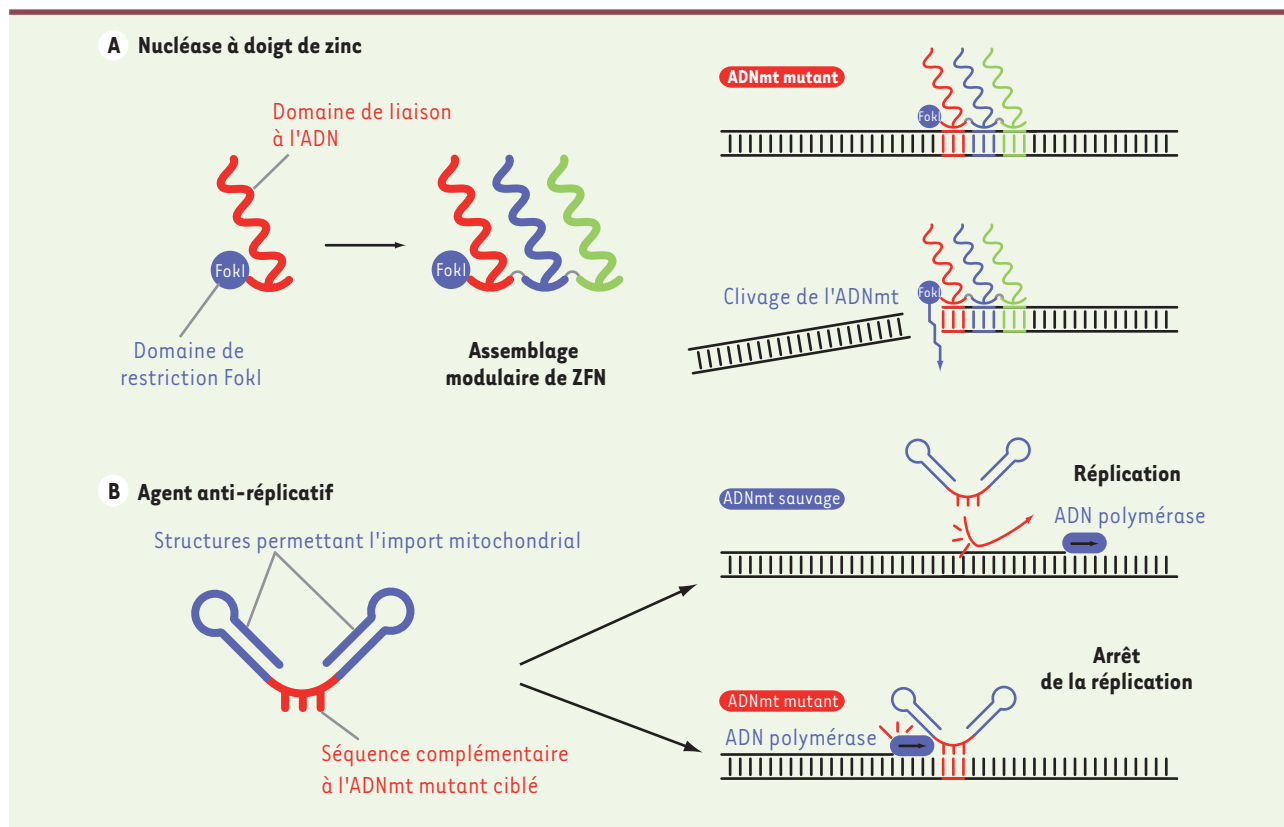


Figure 3. La stratégie anti-génomique. **A.** Schéma d'une nucléase à doigt de zinc (ZFN). Chaque nucléase est constituée d'un domaine de liaison à l'ADN associé à une nucléase FokI. Il est possible d'associer plusieurs domaines de liaison, chacun reconnaissant un triplet de nucléotides défini. Cet assemblage modulaire permet de cibler une séquence spécifique et de cliver l'ADNmt mutant. **B.** Stratégie anti-répllicative. L'agent anti-réplicatif se compose de deux parties : une structure permettant son adressage dans les mitochondries et une partie capable de s'hybrider de manière spécifique à la séquence mutée de l'ADNmt. Sa fixation va bloquer la progression de l'ADN polymérase offrant ainsi un avantage réplcatif au génome mitochondrial sauvage.

pronucléaire - consiste à transférer le noyau de l'ovocyte fécondé (dont l'ADNmt est muté) dans un ovocyte énucléé « sain », c'est-à-dire dépourvu d'ADNmt muté. Chez le singe, la preuve de concept a été apportée que cette procédure de transfert nucléaire (réalisée avec des ovocytes sains) était compatible avec l'implantation et le développement à terme de nouveau-nés viables et fertiles [17]. Chez l'homme, où seule l'étape *in vitro* est possible, cette procédure est compatible avec le développement de l'embryon jusqu'au stade blastocyste [18] ; une procédure d'approbation dans la perspective d'un essai clinique est en cours de discussion au Royaume-Uni¹. Bien qu'encourageante, il est nécessaire d'apporter la plus grande réserve quant à l'utilisation de cette approche, car outre les difficultés techniques et le manque de recul sur son innocuité [19], elle nécessite une réflexion bioéthique approfondie.

Diminution du taux d'hétéroplasmie

Une des stratégies thérapeutiques actuelles, très prometteuse, vise à agir sur le taux d'hétéroplasmie (Figure 1), soit en stimulant la réplication du génome mitochondrial sain, soit au contraire en inhibant celle du génome muté. Cette seconde approche, dite anti-génomique, peut être mise en œuvre par la destruction du génome muté ou par l'inhibition spécifique de sa réplication. Ce type d'approche est d'autant plus intéressant que même une très faible diminution (de l'ordre de quelques pourcents) du taux d'hétéroplasmie pourrait être suffisante pour entraîner une amélioration significative sur le plan clinique.

Enrichissement en ADNmt sauvage

La première stratégie pour enrichir le contenu mitochondrial en ADNmt est de suivre une diète cétogène, c'est-à-dire un régime alimentaire à très basse teneur

¹ Voir le site de la HFEA : <http://www.hfea.gov.uk/9025.html> ; Government decision on mitochondria replacement regulations, 22 July 2014.

en glucides compensée par une plus forte proportion en lipides. Déjà utilisée dans des cas d'épilepsie, cette diète semble être bénéfique pour les individus qui la suivent en conduisant à une augmentation du nombre de copies d'ADNmt sauvage [20] et en assurant une protection neuronale [21]. Une amélioration des symptômes a été observée chez des souris porteuses d'un déficit de l'hélicase Twinkle et accumulant des défauts de leur génome mitochondrial, lorsqu'elles étaient soumises à ce régime, même en l'absence de variations quantitatives ou qualitatives de l'ADNmt [22].

Une autre méthode consiste à induire une régénération musculaire par l'activation de cellules satellites. Ces cellules indifférenciées présentes au sein du muscle squelettique assurent la fonction de cellules souches musculaires et réparent les fibres musculaires endommagées [23]. Leur activation peut être stimulée chimiquement ou mécaniquement par l'exercice. Comme leur taux de mutation est très bas, ces cellules vont enrichir la *pool* de génomes mitochondriaux sains et promouvoir une diminution du taux d'ADNmt mutant. Cette stratégie a déjà été employée avec succès chez un patient porteur d'une mutation du gène codant la sous-unité COXI (*cytochrome c oxidase subunit I*) [24].

Utilisation d'enzymes de restriction

Pour cibler et détruire de manière spécifique le génome mitochondrial muté, un des prérequis est la présence d'un site de restriction qui lui est propre. Dans ce cas, une endonucléase codée par le génome nucléaire et fusionnée à un signal d'import mitochondrial peut être adressée aux mitochondries, où elle clivera spécifiquement l'ADNmt mutant et induira la diminution du nombre de molécules d'ADNmt mutées, une augmentation de la proportion des molécules saines et la reprise de la production d'ATP. En ciblant un site *SmaI* unique, cette méthode a permis de diminuer le taux d'hétéroplasmie d'une mutation affectant le gène codant pour l'ATPase 6 (T8993G) responsable d'un syndrome NARP (neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire) [25] et à une de ses variantes plus sévères, le syndrome MILS (*maternally inherited Leigh's syndrome*). Une augmentation significative de la consommation d'oxygène est observée dans les cellules ainsi traitées. Il est également possible de cibler spécifiquement un organe *via* l'utilisation de vecteurs adénoviraux AAV (*adeno-associated virus*), tels que des vecteurs cardiotropiques et hépatotropiques qui, chez la souris, ont permis de délivrer l'enzyme *ApaI* dans le cœur et le foie, et d'induire une diminution du niveau d'hétéroplasmie [26].

Utilisation de nucléases à doigt de zinc et TALEN

Bien que puissante, l'utilisation d'enzymes de restriction est limitée par une faible fréquence de mutations pathogènes créant un site de restriction unique. Si l'on pouvait cibler n'importe quelle séquence, il serait alors possible d'étendre considérablement le champ d'action de cette stratégie. C'est sur cette idée que se fonde le développement des nucléases à doigt de zinc (ZFN, *zinc-finger nuclease*). Ces peptides sont composés de trois à neuf domaines en doigt de zinc assurant une liaison spécifique de l'ADN sur trois nucléotides [27], ainsi que d'un domaine *FokI*, une endonucléase non spécifique (*Figure 3A*). En modifiant à volonté ces différents triplets de liaison à l'ADN, il est alors possible de créer une

molécule sur mesure capable de reconnaître et de cliver une séquence spécifique. Dans le cas d'une mutation associée à la mutation NARP (T8993G) [28], il a ainsi été possible de détruire spécifiquement la version mutée et de doubler la proportion d'ADNmt sauvage. Récemment, il a été montré que cette même stratégie pouvait également être appliquée *via* l'utilisation de TALEN (*transcription activator-like effector nuclease*) [29] et pouvait induire une diminution du nombre de copies du génome muté, qu'il soit affecté par une large délétion ($\Delta 8483-13459$) ou une mutation ponctuelle (G14459A) dans cellules cybrides [30]. Pour cette dernière, une augmentation du niveau d'activité du complexe I a également été observée.

Stratégie antirépllicative

Hormis le fait de détruire le génome muté, une méthode alternative consiste à en inhiber spécifiquement la réplication (*Figure 3B*). Les agents susceptibles d'induire cette inhibition doivent être non seulement capables de reconnaître l'ADNmt mutant et de s'y fixer avec une haute affinité, mais également de bloquer la machinerie de réplication. Cette approche a été amorcée *via* le développement de PNA (*peptide nucleic acids*) ; ce sont des acides nucléiques synthétiques possédant un squelette peptidique non chargé, capables de former un duplex avec de l'ADN simple brin. Ces molécules artificielles peuvent, *in vitro*, induire un arrêt spécifique de la réplication au niveau d'une mutation (A8344G) responsable du syndrome MERRF (*myoclonus epilepsy and ragged red fibres*) [31]. Bien qu'attrayante, cette approche se heurte à un obstacle de taille, l'impossibilité pour ces molécules de franchir *in vivo* la membrane interne des mitochondries, et ce malgré la présence d'un peptide d'adressage ou de cations lipophiles. Pour remédier à ce problème, une solution consiste à tirer parti de la voie naturelle d'import des ARN dans les mitochondries pour adresser dans ces organites des molécules au potentiel thérapeutique. De petits ARN artificiels, formés sur la base des déterminants de l'ARN^{t^{Lys}} de levure, ont ainsi été modélisés et sont capables d'être importés dans les mitochondries de cellules humaines. Ils possèdent également une séquence complémentaire de celle de l'ADNmt mutant, qui leur permet de s'hybrider à cet ADN et de bloquer la progression de l'ADN polymérase, offrant ainsi un avantage répliatif aux molécules d'ADNmt sauvage. Ces molécules induisent une diminution de l'ordre de 30 % du taux d'hétéroplasmie et la reprise de la traduction mitochondriale dans des cellules porteuses d'une large délétion ($\Delta 8365-15439$) associée au syndrome de Kearns Sayre [32]. Comme démontré plus récemment, cette approche est aussi

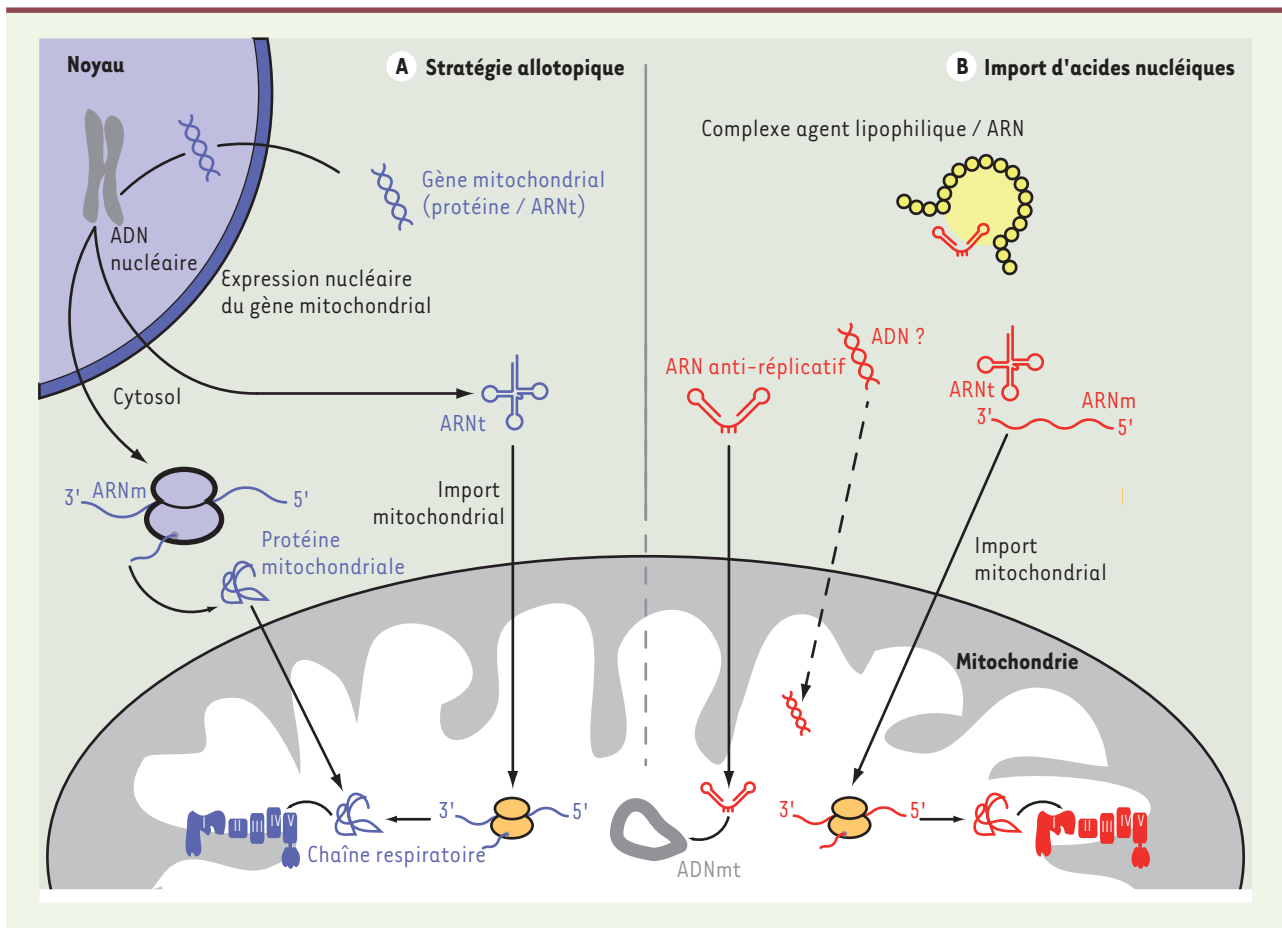


Figure 4. Stratégies allotopique et d'import d'ARN dans les mitochondries. **A.** Stratégie allotopique. Un gène mitochondrial recodé selon le code génétique universel peut être transcrit dans le noyau. L'ARNm correspondant sera traduit à proximité de la surface mitochondriale et la protéine immédiatement importée grâce à un signal d'import mitochondrial. Outre des protéines, des ARNt peuvent également être exprimés via le génome nucléaire. **B.** Import d'acides nucléiques. Différentes molécules (ADN, ARNt, ARNm, ARN anti-réplicatif, etc.) peuvent être introduites dans la cellule, puis directement importées dans la mitochondrie.

efficace vis-à-vis d'une mutation ponctuelle (A13514G) dans le gène *ND5* (*NADH dehydrogenase, subunit 5*) associée à un syndrome MELAS (*mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes*), où la diminution du taux d'ADNmt mutant est corrélée à une augmentation du nombre de mitochondries [33].

Remplacement des composants mitochondriaux défectueux

Expression allotopique de protéines

La stratégie allotopique consiste en l'expression nucléaire du gène codant pour une protéine mitochondriale et à l'adressage de cette dernière dans les mitochondries où elle compensera la défaillance de son homologue mutée (Figure 4A). Il est nécessaire que la protéine soit dotée d'un signal d'import, mais également que l'ADNmt correspondant au gène soit modifié pour adopter le code génétique universel. Bien que la méthode ait fait ses preuves chez la levure où l'ATPase 8 fut exprimée, importée et assemblée avec succès dans le complexe V, permettant la complémentation fonctionnelle du déficit

lié à la délétion du gène [34], les résultats obtenus chez les mammifères sont plus contrastés. En effet, alors que les premiers travaux menés sur le gène de l'ATPase 6 avaient montré une restauration des fonctions mitochondriales, des résultats contradictoires sont apparus, révélant que la protéine exprimée n'était pas importée dans les mitochondries [35]. En effet, l'approche allotopique est limitée par la grande hydrophobicité des protéines mitochondriales, qui compromet fortement leur import. Ce phénomène est parfaitement illustré par la sous-unité ND4 qui, lors de son expression, entraîna la formation d'agrégats cytoplasmiques obstruant les pores mitochondriaux [36]. Pour contourner ce problème, une approche a été développée qui assure l'adressage des ARNm au niveau de la surface des mitochondries. Cela a ainsi permis l'import immédiat des sous-unités du complexe I, dont l'activité a été restaurée dans des

fibroblastes en culture porteurs de plusieurs mutations au niveau des gènes *ND1*, *ND4* et *ND6* associées au syndrome LHON (*Leber's hereditary optic neuropathy*) [36].

Import d'ARNt

La moitié des mutations de l'ADNmt affectent des gènes codant des ARNt ; celles-ci tendent à réduire le niveau et la proportion d'ARNt amino-acylés, ce qui entraîne des défauts de traduction ayant un impact sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Alors que les mécanismes qui assurent l'import des ARNt dans la levure sont bien compris, ce processus recèle encore quelques mystères chez les mammifères. En s'appuyant sur l'étude des caractéristiques structurales de l'ARNt^{Lys}_{CUU} de *Saccharomyces cerevisiae*, il a été démontré que des variants de cet ARNt cytosolique peuvent être importés dans les mitochondries humaines (*Figure 4B*), où ils restaurent la traduction et compensent les défauts respiratoires résultant du dysfonctionnement de l'ARNt^{Lys} mitochondrial associé à un syndrome MERRF (mutation A8344G) [37]. Le même type d'approche a été développé pour corriger les conséquences d'une mutation affectant le gène de l'ARNt^{Leu} (A3243G) et associée à l'apparition d'un syndrome MELAS. Dans ce cas, il a été nécessaire d'adapter l'ARNt pour assurer son amino-acylation et lui permettre de reconnaître de manière spécifique le codon leucine [38]. La mise en œuvre de cette stratégie nécessite d'adapter l'ARNt cytosolique importé dans les mitochondries et ce pour chaque ARNt mitochondrial muté et, ainsi, permettre son amino-acylation et son décodage spécifique.

Un défaut structural dû à une mutation d'un ARNt peut se traduire par une diminution de son niveau d'amino-acylation [39]. Pour compenser cet effet, il est possible de surexprimer des ARNt synthétases comme cela a été fait pour LARS2 (leucyl-ARNt synthétase mitochondriale) dans des cellules cybrides porteuses de la mutation MELAS (A3243G) ; une augmentation de la consommation en oxygène proportionnelle au niveau de la synthétase a été observée [40]. Une approche plus générale consiste en la surexpression d'ARNt synthétases de classe I, qui sont en mesure de stabiliser la structure de différents ARNt mitochondriaux induisant ainsi une augmentation de la synthèse protéique [41].

Outre les ARNt, il est également possible d'importer d'autres acides nucléiques (*Figure 4B*) dans les mitochondries, tels que de l'ADN [42], des ARNm [43] ou de petits ARN anti-réplicatifs [32, 33].

Conclusion

En 2012, une revue Cochrane² fit état des traitements actuellement disponibles dans les maladies mitochondriales et conclut qu'aucun des essais effectués chez l'homme n'avait prouvé sa réelle efficacité [44]. Néanmoins, ces conclusions, fondées sur les essais thérapeutiques effectués, se concentraient sur des preuves expérimentales cliniques

et ne pouvaient pas prendre en compte les nombreuses stratégies actuellement explorées. En effet, il importe de souligner qu'en dépit de la quasi-absence de thérapie ayant fait preuve d'une efficacité clinique avérée, il existe un foisonnement de nouvelles stratégies thérapeutiques prometteuses, encore au stade expérimental. De ce fait, même si le chemin est encore long, ces études apportent un espoir pour le développement de thérapies des maladies mitochondriales chez l'homme et, donc, pour les malades et leur famille. ♦

SUMMARY

Mitochondrial DNA diseases and therapeutic strategies

Defects in mitochondrial genome can cause a wide range of clinical disorders, mainly neuromuscular diseases. Various strategies have been proposed to address these pathologies; unfortunately no efficient treatment is currently available. In some cases, defects may be rescued by targeting into mitochondria nuclear DNA-expressed counterparts of the affected molecules. Another strategy is based on the induced shift of the heteroplasmy, meaning that wild type and mutated mtDNA can coexist in a single cell. The occurrence and severity of the disease depend on the heteroplasmy level, therefore, several approaches have been recently proposed to selectively reduce the levels of mutant mtDNA. Here we describe the experimental systems used to study the molecular mechanisms of mitochondrial dysfunctions: the respiratory deficient yeast strains, mammalian *trans*-mitochondrial cybrid cells and mice models, and overview the recent advances in development of various therapeutic approaches. ♦

REMERCIEMENTS

Les auteurs remercient la FRM (Fondation pour la recherche médicale) et l'AFM (Association française contre les myopathies) pour leur soutien financier. Ce travail a été publié dans le cadre du LABEX ANR-11-LABX-0057_MITOCROSS et a bénéficié d'une aide de l'état générée par l'Agence nationale de la recherche au titre du programme d'Investissements d'avenir. Les auteurs tiennent également à remercier le Dr Ivan Tarassov, le Dr Caroline Comte et Anne-Marie Heckel, ainsi que l'ensemble des membres de l'équipe « Trafic intracellulaire d'ARN et maladies mitochondriales » de l'UMR 7156. Enfin, nous adressons également nos remerciements aux rapporteurs de cet article pour leurs corrections et leurs judicieux conseils.

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

² La revue Cochrane est une revue systématique basée sur la compilation et l'analyse rigoureuse d'articles scientifiques et médicaux traitant d'un sujet donné. Elle se base sur une méta-analyse de résumés scientifiques et a pour but d'identifier les pratiques de soin les plus efficaces afin d'apporter une amélioration méthodologique à la recherche biomédicale.

RÉFÉRENCES

1. Sarzi E, Rötig A. Instabilité du génome mitochondrial et pathologies associées. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 171-6.
2. Lenaers G, Amati-Bonneau P, Delettre C, et al. De la levure aux maladies neuro-dégénératives. *Med Sci (Paris)* 2010 ; 26 : 836-41.
3. Voisset C, Blondel M. Chémobiologie à l'happy hour : la levure comme modèle de criblage pharmacologique. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 1161-8.
4. Kucharczyk R, Rak M, di Rago JP. Biochemical consequences in yeast of the human mitochondrial DNA 8993T>C mutation in the ATPase6 gene found in NARP/MILS patients. *Biochim Biophys Acta* 2009 ; 1793 : 817-24.
5. Montanari A, Zhou YF, D'Orsi MF, et al. Analyzing the suppression of respiratory defects in the yeast model of human mitochondrial tRNA diseases. *Gene* 2013 ; 527 : 1-9.
6. Coulombel L. Reprogrammation nucléaire d'une cellule différenciée : on efface tout et on recommence. *Med Sci (Paris)* 2007 ; 23 : 667-70.
7. King MP, Attardi G. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 1989 ; 246 : 500-3.
8. Swerdlow RH. Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondrialriopathies. *J Neurosci Res* 2007 ; 85 : 2816-28.
9. Qiang B, Hamamah S, De Vos J. iPS : des erreurs de jeunesse ? *Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 805-7.
10. Jenuth JP, Peterson AC, Shoubridge EA. Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat Genet* 1997 ; 16 : 93-5.
11. Nakada K, Hayashi J. Transmittochondrial mice as models for mitochondrial DNA-based diseases. *Exp Anim* 2011 ; 60 : 421-31.
12. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, et al. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* 2004 ; 429 : 417-23.
13. Tynismaa H, Mjosund KP, Wanrooi S, et al. Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005 ; 102 : 17687-92.
14. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, et al. Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice [see comments]. *Nat Genet* 1998 ; 18 : 231-6.
15. Brown DT, Herbert M, Lamb VK, et al. Transmission of mitochondrial DNA disorders: possibilities for the future. *Lancet* 2006 ; 368 : 87-9.
16. Fulka J, Jr, Fulka H, John JC. Transmission of mitochondrial DNA disorders: possibilities for the elimination of mutated mitochondria. *Cloning Stem Cells* 2007 ; 9 : 47-50.
17. Hafner S, Coulombel L. Naissance de Mito et Tracker. *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 802-3.
18. Craven L, Tuppen HA, Greggains GD, et al. Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* 2010 ; 465 : 82-5.
19. Steffann J, Gigarel N, Samuels DC, et al. Data from artificial models of mitochondrial DNA disorders are not always applicable to humans. *Cell Rep* 2014 ; 7 : 933-4.
20. Santra S, Gilkerson RW, Davidson M, Schon EA. Ketogenic treatment reduces deleted mitochondrial DNAs in cultured human cells. *Ann Neurol* 2004 ; 56 : 662-9.
21. Noh HS, Kim YS, Choi WS. Neuroprotective effects of the ketogenic diet. *Epilepsia* 2008 ; 49 Suppl 8 : 120-3.
22. Ahola-Erkila S, Carroll CJ, Peltola-Mjosund K, et al. Ketogenic diet slows down mitochondrial myopathy progression in mice. *Hum Mol Genet* 2010 ; 19 : 1974-84.
23. Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 2001 ; 91 : 534-51.
24. Andrews RM, Griffiths PG, Chinnery PF, Turnbull DM. Evaluation of bupivacaine-induced muscle regeneration in the treatment of ptosis in patients with chronic progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *Eye (Lond)* 1999 ; 13 : 769-72.
25. Alexeyev MF, Venediktova N, Pastukh V, et al. Selective elimination of mutant mitochondrial genomes as therapeutic strategy for the treatment of NARP and MILS syndromes. *Gene Ther* 2008 ; 15 : 516-23.
26. Bacman SR, Williams SL, Garcia S, Moraes CT. Organ-specific shifts in mtDNA heteroplasmy following systemic delivery of a mitochondria-targeted restriction endonuclease. *Gene Ther* 2010 ; 17 : 713-20.
27. Klug A. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem* 2010 ; 79 : 213-31.
28. Minczuk M, Papworth MA, Miller JC, et al. Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 2008 ; 36 : 3926-38.
29. Dupret B, Angrand PO. L'ingénierie des génomes par les TALEN. *Med Sci (Paris)* 2014 ; 30 : 186-93.
30. Bacman SR, Williams SL, Pinto M, et al. Specific elimination of mutant mitochondrial genomes in patient-derived cells by mitoTALENs. *Nat Med* 2013 ; 19 : 1111-3.
31. Taylor RW, Chinnery PF, Turnbull DM, Lightowlers RN. Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication *in vitro* by peptide nucleic acids. *Nat Genet* 1997 ; 15 : 212-5.
32. Comte C, Tonin Y, Heckel-Mager AM, et al. Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome. *Nucleic Acids Res* 2013 ; 41 : 418-33.
33. Tonin Y, Heckel AM, Vysokikh M, et al. Modeling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 2014 ; 289 : 13323-34.
34. Gray RE, Law RH, Devenish RJ, Nagley P. Allotopic expression of mitochondrial ATP synthase genes in nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 1996 ; 264 : 369-89.
35. Perales-Clemente E, Fernandez-Silva P, Acin-Perez R, et al. Allotopic expression of mitochondrial-encoded genes in mammals: achieved goal, undemonstrated mechanism or impossible task? *Nucleic Acids Res* 2010 ; 39 : 225-34.
36. Bonnet C, Augustin S, Ellouze S, et al. The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes. *Biochim Biophys Acta* 2008 ; 1783 : 1707-17.
37. Kolesnikova OA, Entelis NS, Jacquin-Becker C, et al. Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum Mol Genet* 2004 ; 13 : 2519-34.
38. Karicheva OZ, Kolesnikova OA, Schirtz T, et al. Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria. *Nucleic Acids Res* 2011 ; 39 : 8173-86.
39. Belostotsky R, Frishberg Y, Entelis N. Human mitochondrial tRNA quality control in health and disease: A channeling mechanism? *RNA Biol* 2012 ; 9 : 33-9.
40. Li R, Guan MX. Human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase corrects mitochondrial dysfunctions due to the tRNA^{Leu}(UUR) A3243G mutation, associated with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like symptoms and diabetes. *Mol Cell Biol* 2010 ; 30 : 2147-54.
41. Hornig-Do HT, Montanari A, Rozanska A, et al. Human mitochondrial leucyl tRNA synthetase can suppress non cognate pathogenic mt-tRNA mutations. *EMBO Mol Med* 2014 ; 6 : 183-93.
42. Ibrahim N, Handa H, Cosset A, et al. DNA delivery to mitochondria: Sequence specificity and energy enhancement. *Pharm Res* 2011 ; 28 : 2871-82.
43. Wang G, Shimada E, Zhang J, et al. Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *Proc Natl Acad Sci USA* 2012 ; 109 : 4840-5.
44. Pfeiffer G, Majamaa K, Turnbull DM, et al. Treatment for mitochondrial disorders. *Cochrane Database Syst Rev* 2012 ; 4 : CD004426.

TIRÉS À PART

Y. Tonin



Tarifs d'abonnement m/s - 2015

**Abonnez-vous
à médecine/sciences**

> Grâce à m/s, vivez en direct les progrès
des sciences biologiques et médicales

**Bulletin d'abonnement
page 1189 dans ce numéro de m/s**

