

## **M**aladies mitochondriales : génétique, pathogénie et perspectives thérapeutiques

Du 16 au 19 septembre 1995 se déroulait à Chantilly le troisième congrès international sur les maladies mitochondriales humaines. Deux cents participants ont rendu un dernier hommage à une grande personnalité des maladies mitochondriales en la personne d'Anita Harding, présidente scientifique d'Euromit III, décédée récemment. Le Pr A. Harding et son groupe (Londres, Royaume-Uni) furent les premiers à associer une mutation du génome mitochondrial à des myopathies caractérisées par une perturbation du métabolisme énergétique [1].

L'énergie nécessaire au fonctionnement cellulaire est produite par la chaîne respiratoire mitochondriale. Les protéines qui constituent cette chaîne respiratoire ont une double origine génétique: le génome mitochondrial (ADNmt) et le génome nucléaire. L'ADNmt, dont la séquence chez l'homme est connue depuis 1981, est transmis exclusivement par la mère (hérédité maternelle). Plusieurs molécules d'ADNmt (de 2 à 10) sont présentes dans un même organe; son expression et sa répllication sont sous le contrôle d'enzymes nucléaires.

Cet article veut résumer les résultats les plus marquants ayant fait l'objet de communications orales au cours de ce congrès. Dans un premier temps seront abordés les résultats obtenus sur les maladies associées à des altérations du génome mitochondrial, puis les nouvelles données sur les maladies sans atteinte de l'ADNmt. Enfin, la dernière partie sera consacrée aux différentes stratégies thérapeutiques envisageables.

Les maladies mitochondriales sont cliniquement hétérogènes allant de

l'acidose lactique néonatale à la fatigabilité musculaire de l'adulte. Au niveau génétique, des dysfonctionnements de la chaîne respiratoire peuvent être la conséquence de mutations du génome mitochondrial et/ou de gènes nucléaires. Les premières mutations décrites ont été retrouvées dans l'ADNmt et sont hétéroplasmiques (coexistence de molécules normales et mutées dans une même cellule).

### **Maladies associées à des altérations du génome mitochondrial**

#### • *Grands réarrangements de l'ADNmt*

Des grands remaniements (délétions, duplications) ont été retrouvés dans le muscle de patients présentant des OCPE (ophtalmoplégies chroniques progressives externes), des syndromes de Kearns-Sayre et des syndromes de Pearson [2, 3]. Ces patients sont généralement des cas sporadiques sans antécédents familiaux. Poulton *et al.* (Oxford, Royaume-Uni) ont montré que les duplications coexistaient avec les délétions, et que les duplications seraient antérieures aux délétions [4].

D'autres réarrangements, les délétions multiples (présence de molécules délétées de différentes longueurs), sont transmis selon le mode autosomique dominant: les délétions multiples sont généralement associées à des formes de myopathies avec atteinte oculaire importante: ce sont des maladies qui atteignent préférentiellement l'adulte. A partir de familles informatives, une recherche de liaison entre des marqueurs connus sur le génome humain et le gène impliqué dans ces maladies a été réalisée pour la pre-

mière fois dans les maladies mitochondriales: un *locus* situé sur le chromosome 10 (q23-24) a été lié à la présence de délétions multiples de l'ADNmt dans une famille finlandaise (*m/s n° 5, vol. 11, p. 785*) [5]. Mais ce *locus* n'est pas lié à la présence de délétions multiples dans le cas de familles italiennes; pour ces dernières, deux *loci* différents, dont la position n'a pas été précisée, sont impliqués dans la formation des délétions multiples de l'ADNmt. La recherche de mutations dans l'ADNc de gènes candidats, jouant un rôle dans la stabilité et l'expression du génome mt (mtTFA: facteur de transcription mt; SSBP: protéine impliquée dans la stabilité du monobrin pendant la réplication...), n'a pas donné de résultats positifs, mais ces travaux ont permis de localiser au niveau chromosomique les gènes humains codant pour mtTFA, SSBP et l'endonucléase G [6]. De nouveaux gènes jouant un rôle dans la stabilité du génome mitochondrial, déjà caractérisés chez la bactérie (famille de gènes *MutS*), sont en cours d'identification chez l'homme (V. Paquis-Flucklinger *et al.*, Nice, France).

#### • *Mutations ponctuelles*

L'atrophie optique héréditaire de Leber, maladie plus fréquente chez les garçons que chez les filles, est associée à des mutations ponctuelles dans des gènes de structure de l'ADNmt (*m/s n° 9, vol. 5, p. 691*): certaines de ces mutations sont nécessaires (mutations: 11778, 3460, 14484) mais non suffisantes pour l'expression du phénotype clinique. L'association entre un *locus* du chromosome X et cette maladie, trouvée

dans une famille finlandaise, n'a pu être mise en évidence dans les familles présentées par Chalmers *et al.* (Londres, Royaume-Uni) [7].

De nombreuses mutations ponctuelles sont situées dans les gènes d'ARNt. Une mutation située dans un gène codant pour l'ARNt<sup>Lys</sup> mitochondrial à la position 8344 est associée au syndrome de MERRF (myopathies, encéphalopathies avec fibres musculaires en lambeaux); elle est responsable de la diminution de la synthèse protéique mitochondriale observée sur des cybrides (cellules chimères ayant un noyau normal et des mitochondries mutantes). Enriquez *et al.* (Pasadena, CA, USA) ont démontré sur ces cybrides homoplasmatiques pour la mutation MERRF (100% d'ADNmt muté) que l'étape d'aminocyclation de ces ARNt mutés était altérée, de même que l'élongation de la chaîne peptidique (peptides tronqués) [8]. Le rôle de ces mutations ponctuelles situées dans les gènes d'ARNt (dont le nombre augmente sans cesse) sur la structure et la fonction de ces ARNt a été abordé par des expériences utilisant des transcrits obtenus *in vitro*. Florentz *et al.* (Strasbourg, France) ont ainsi pu démontrer que le transcrit Lys muté était plus stable à la dénaturation thermique que le transcrit normal.

#### • Déplétions

Outre ces anomalies qualitatives de l'ADNmt, des altérations quantitatives (le terme déplétion étant pris dans le sens de réduction très importante de la quantité d'ADNmt) ont été rapportées par Van Den Bogert *et al.* (Amsterdam, Pays-Bas) dans un cas avec insuffisance hépatique néonatale [9]. Le facteur de transcription NRF1, régulateur de la transcription de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales [10], pourrait être impliqué dans les déplétions rapportées.

#### Maladies non associées à des mutations du génome mitochondrial

Pour caractériser le rôle du génome nucléaire dans certaines maladies mitochondriales, la technique de cybrides a également été utilisée\*. Ainsi Zeviani *et al.* (Milan, Italie) ont confirmé l'origine nucléaire d'un déficit en cytochrome C oxydase chez un malade présentant un syndrome de Leigh [11].

Bourgeron *et al.* (Paris, France) ont associé, pour la première fois, une mutation dans un gène nucléaire (gène codant pour la succinate déshydrogénase) à un déficit de la chaîne respiratoire et ont montré que la mutation trouvée entraînait une diminution de l'activité enzymatique [12].

Des déficits en activité pyruvate déshydrogénase (PDH: complexe composé de 5 sous-unités E1 $\alpha$  et  $\beta$ , E2, E3 et X) ont été associés à des mutations du gène *E1 $\alpha$ PDH* [13] mais aussi à des diminutions quantitatives de la protéine X dont la fonction était jusqu'à présent inconnue. Cependant, Lindsay *et al.* (Glasgow, Royaume-Uni) viennent de démontrer que la fonction de cette sous-unité est de fixer les sous-unités E2 et E3 du complexe PDH entre elles [14].

Un aspect nouveau dans la pathologie mitochondriale est l'implication des radicaux libres de l'oxygène: en effet, il a été montré que des déficits en complexe I (fibroblastes cutanés de patients présentant des encéphalomyélopathies mitochondriales) étaient associés à l'induction d'une enzyme antioxydante mitochondriale: la superoxyde dismutase dépendante du manganèse (MnSOD) (Robinson *et al.*, Montréal, Canada). Cela a été corroboré par des expériences d'inactivation par recombinaison homologue (*knock-out*) du gène codant pour cette enzyme chez la souris: l'inactivation du gène est létale au bout d'une semaine. Elle induit des diminutions des activités des complexes I et III de la chaîne respiratoire sans atteinte de l'activité du complexe IV; l'hypothèse est que les radicaux libres, agissant sur les

centres [4Fe-4S] de ces protéines, altéreraient leur fonction (Wallace *et al.*, Atlanta, GE, USA). Les radicaux libres sont une des causes des altérations du métabolisme énergétique au cours du vieillissement cérébral et seraient à l'origine de l'accumulation de mutations du génome mitochondrial [15]. Ces résultats concernant l'origine du vieillissement ont été discutés par les tenants de deux écoles de pensée: ceux qui défendent le rôle fondamental des réarrangements du génome nucléaire (Hayashi *et al.*, Tsukuba, Japon [16]) et ceux qui sont en faveur du rôle prédominant des mutations de l'ADNmt (Cortopassi *et al.*, CA, USA [17]).

#### Perspectives de thérapies géniques

Une table ronde a permis de discuter des thérapeutiques actuelles pour le traitement des maladies mitochondriales. Des traitements classiques ont pu, dans certains cas, améliorer la symptomatologie clinique et les paramètres biochimiques de certaines maladies (coenzyme Q, dichloroacétate, antioxydants, ménadione, riboflavine...) mais la recherche thérapeutique fondée sur la thérapie génique semble plus prometteuse [18]. Schon *et al.* (New York, USA) ont démontré que des mitochondries possédant des génomes différents (délétions situées dans des régions distinctes) pouvaient se compléter lorsqu'elles coexistaient dans une même cellule. Cependant, cette complémentarité entre deux types de mitochondries ne peut avoir lieu si les génomes mitochondriaux portent des mutations ponctuelles dans des gènes d'ARNt différents [19]. La compréhension des mécanismes de complémentarité ou de non-complémentarité inter-organite sera une donnée importante pour progresser vers la thérapie génique. Trois stratégies différentes ont été proposées (*figure 1*): (1) le groupe de Jacobs (Glasgow, Royaume-Uni) se propose de remplacer les gènes de structure mitochondriales mutés en exprimant dans le noyau le gène normal couplé à une séquence de ciblage mitochondrial. Cette tech-

\* Produits de la fusion d'une cellule possédant un noyau « mutant » (celui du malade) et des mitochondries provenant de cellules témoins.

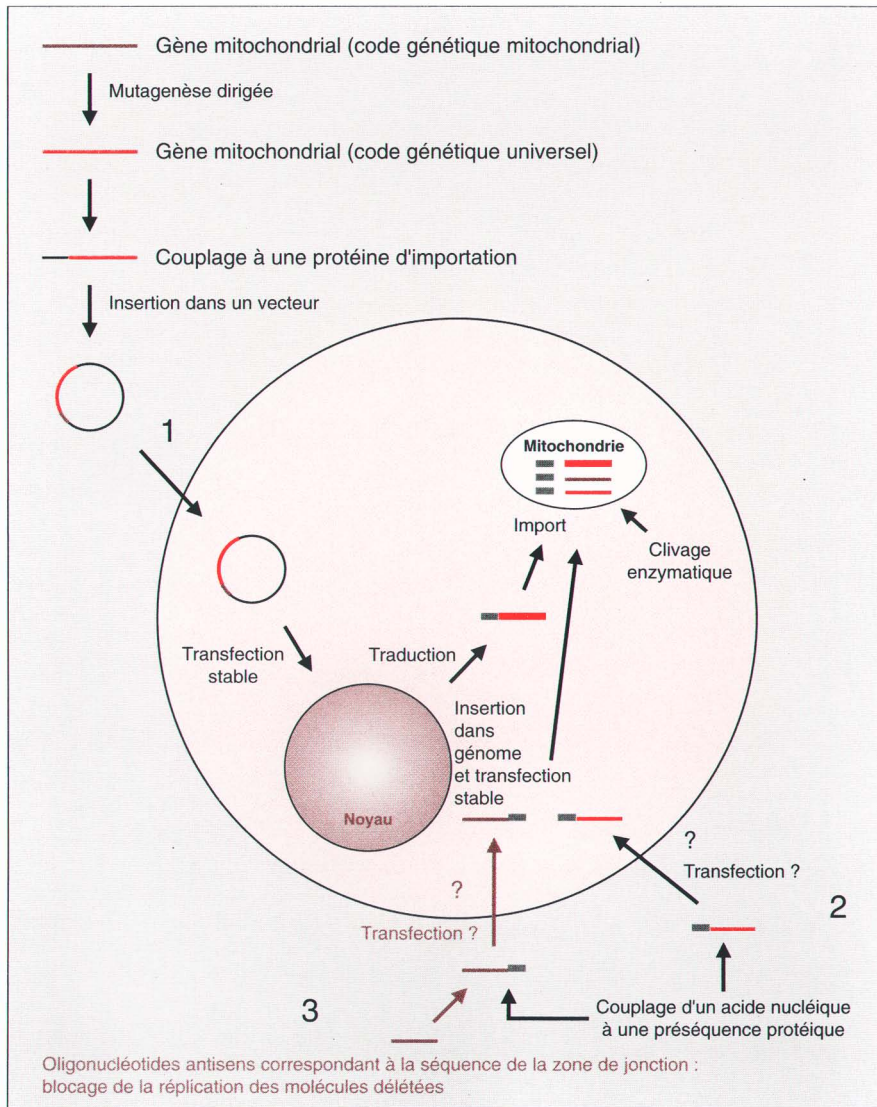


Figure 1. **Stratégies de thérapie génique pour suppléer ou corriger les mutations du génome mitochondrial.** (1) Les gènes de l'ADN mitochondrial (ADNmt) peuvent être transcodés en code universel, transférés dans la cellule à l'aide d'un vecteur, transcrits dans le noyau de la cellule, et la protéine synthétisée dans le cytoplasme couplée à une séquence d'importation dans la mitochondrie; (2) couplage d'un acide nucléique et d'une préséquence protéique d'importation dans la mitochondrie. (3) des oligonucléotides antisens se fixant spécifiquement sur les protéines mutées permettent leur élimination au cours de la réplication.

nique nécessite de modifier les codons mitochondriaux qui diffèrent du code génétique universel. Cela a été réalisé par mutagenèse dirigée du gène codant pour l'ATPase 6 mitochondriale dont une mutation ponctuelle en position 8993 est trouvée dans des cas d'encéphalomyopathies graves. La protéine normale synthétisée dans le cytoplasme est transférée dans la mitochondrie grâce à sa séquence de ciblage; le clivage de cette dernière permet de

relarguer dans la matrice la protéine normale. Ces étapes ont pu être menées à bien *in vitro*. L'avantage de cette approche est qu'elle peut corriger les mutations de gènes de structure pour lesquelles un fort pourcentage de gène mutant est nécessaire pour l'expression du déficit enzymatique (>90%). Ainsi, la synthèse d'une faible quantité de protéines normales (<10%) abolirait l'effet délétère de la mutation; (2) la deuxième approche consiste à

faire parvenir dans les mitochondries une protéine non pas seule mais couplée à des acides nucléiques codant, soit pour des protéines, soit pour des ARNt ou ARNr. Cette technique développée par Seibel *et al.* (Würzburg, Allemagne) utilise aussi les séquences de ciblage vers la mitochondrie, mais cette séquence est couplée chimiquement à un acide nucléique. Ainsi, des séquences d'ADN (de 0,3 à 3 kb) ont pu être importées dans des



mitochondries isolées de foie de rat [20], les étapes de clivage au niveau des membranes étant correctement réalisés. La transfection des cellules avec ce type de construction est en cours d'investigation ; (3) une stratégie différente a été développée par Turnbull *et al.* (Newcastle upon Tyne, Royaume-Uni) : elle consiste non pas à suppléer un déficit ou une fonction perturbée, mais à éliminer les molécules d'ADNmt mutantes par l'utilisation d'oligonucléotides antisens se fixant spécifiquement sur les molécules mutées et permettant ainsi leur élimination au cours du processus de réplication. Le ciblage de séquences nucléiques vers la mitochondrie à l'aide du couplage précédemment décrit, entre une protéine et un acide nucléique, pourrait permettre d'atteindre ce but ■

## RÉFÉRENCES

- Holt I, Harding A, Morgan-Hughes J. Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* 1988; 331: 717-9.
- Nelson I, Degoul F, Marsac C, Ponsot G, Lestienne P. Des délétions de l'ADN mitochondrial dans le syndrome de Kearns-Sayre et autres myopathies avec ophtalmoplégie externe progressive. *médecine/sciences* 1989; 5: 472-9.
- Dreyfus JC. Les maladies du génome mitochondrial. *médecine/sciences* 1991; 7: 172-4.
- Poulton J, Morten K, Marchington D, Weber K, Brown G, Rötig A, Bindoff L. Duplications of mitochondrial DNA in Kearns-Sayre syndrome. *Muscle Nerve* 1995; 3 (suppl): 154-8.
- Suomalainen A, Kaukonen J, Amati P, Timonen R, Haltia M, Weissenbach J, Zeviani M, Somer H, Peltonen L. An autosomal locus predisposing to deletions of mitochondrial DNA. *Nature Genet* 1995; 9: 146-51.
- Tiranti V, Rossi E, Ruiz-Carillo A, Rossi G, Rocchi M, DiDonato S, Zuffardi O, Zeviani M. Chromosomal localization of mitochondrial transcription factor A (TCF6), single-stranded DNA-binding protein (SSBP) and endonuclease G (ENDOG), three human housekeeping genes involved in mitochondrial biogenesis. *Genomics* 1995; 25: 559-64.
- Riordan-Eva P, Sanders M, Govan G, Sweeney M, DaCosta J, Harding A. The clinical features of Leber's hereditary optic neuropathy defined by the presence of a pathogenic mitochondrial DNA mutation. *Brain* 1995; 118: 319-37.
- Enriquez JA, Chomyn A, Attardi G. MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNALys and premature translation termination. *Nature Genet* 1995; 10: 47-55.
- Nijtmans L, Spelbrink J, Van Galen M, Zwaan M, Klement P, Van Den Bogert C. Expression and fate of the nuclear encoded subunits of cytochrome C oxidase in cultured human cells depleted of mitochondrial gene products. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1265: 117-26.
- Virbasius C, Virbasius J, Scarpulla C. NRF-1, an activator involved in nuclear-mitochondrial interactions, utilizes a new DNA-binding domain conserved in a family of developmental regulators. *Genes Dev* 1993; 7: 2431-45.
- Tiranti V, Munoro M, Sandona D, Lamantea E, Rimoli M, DiDomoto S, Bissom R, Zeviani M. Nuclear DNA origin of cytochrome C oxidase deficiency in Leigh's syndrome: genetic evidence based on patients derived rho<sup>o</sup> transformation. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 2017-23.
- Bourgeron T, Rustin P, Chrétien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, Munnich A, Rötig A. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature Genet* 1995; 11: 144-9.
- Lissens W, Desguerre I, Benelli C, Marsac C, Fouque F, Haenggeli C, Ponsot G, Seneca S, Liebaers I, De Meirleir L. Pyruvate dehydrogenase deficiency in a female due to a 4 base pair deletion in exon 10 of the EI Gene. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 307-8.
- Sanderson S, Miller C, Lindsay G. Stoichiometry, organisation and catalytic function of protein X of the pyruvate dehydrogenase complex from bovine heart. *Eur J Biochem* 1996 (sous presse).
- Wallace D, Shoffner J, Trounce I, Brown M, Ballinger S, Corral-Debrinski M, Horton T, Jun A, Lott M. Mitochondrial DNA mutations in human degenerative diseases and aging. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1271: 141-51.
- Hayashi J, Ohta S, Kagawa Y, Kondo H, Kaneda H, Yonekawa H, Takai D, Miyabayashi S. Nuclear but not mitochondrial genome involvement in human age-related mitochondrial dysfunction. *J Biol Chem* 1994; 269: 6878-83.
- Hutchin T, Cortopassi G. A mitochondrial DNA clone is associated with increased risk for Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92: 6892-5.
- Chrzanowska-Lightowlers Z, Lightowlers R, Turnbull D. Gene therapy for mitochondrial DNA defects: is it possible? *Gene Ther* 1995; 2: 311-6.
- Yoneda M, Miyatake T, Attardi G. Complementation of mutant and wild-type human mitochondrial DNAs coexisting since the mutation event and lack of complementation of DNAs introduced separately into a cell within distinct organelles. *Mol Cell Biol* 1994; 14: 2699-712.
- Seibel P, Trappe J, Klopstock T, Papa S, Reichmann H. Transfection of mitochondria: towards a gene therapy of mitochondrial DNA diseases. *Nucleic Acids Res* 1995; 23: 10-17.

### Stéphanie Possekel

Fachbereich Chemie der Philipps-Universität, Hans Meerwein strasse, 35032 Marburg, Allemagne.

### Éric Boitier

### Cécile Marsac

### Françoise Degoul

Inserm U.75, 156, rue de Vaugirard, 75730 Paris Cedex 15, France.

## TIRÉS À PART

F. Degoul.

## UTILISATION DES MODÈLES IN VITRO EN PHARMACO-TOXICOLOGIE

5-16 février 1996

- Sous l'égide de la **Société de Pharmacotoxycologie Cellulaire**, le laboratoire de Pharmacologie Cellulaire de l'École Pratique des Hautes Études organise une formation dont le but est de faire le point sur les progrès technologiques récents en matière de culture cellulaire et leurs apports dans le développement de méthodologies alternatives à l'expérimentation animale.
- Ce stage entre dans le cadre de la formation permanente et s'adresse aux chercheurs et techniciens scientifiques des secteurs privé et public.

**Responsables scientifiques :** Monique Adolphe, Sylvie Demignot, Sophie Thénét Gauci - Laboratoire de Pharmacologie cellulaire de l'École Pratique des Hautes Études - 15, rue de l'École-de-Médecine - 75006 Paris Tél. : 43.29.28.69/28.70 - Fax : 44.07.10.52.