



**HAL**  
open science

# PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE DE CHARCOT-MARIE- TOOTH DE TYPE 4A/2K ASSOCIEE AUX MUTATIONS DU GENE GDAP1

Julien Cassereau

► **To cite this version:**

Julien Cassereau. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE DE CHARCOT-MARIE- TOOTH DE TYPE 4A/2K ASSOCIEE AUX MUTATIONS DU GENE GDAP1. Neurosciences [q-bio.NC]. Université d'Angers, 2011. Français. NNT: . tel-00994796v1

**HAL Id: tel-00994796**

**<https://theses.hal.science/tel-00994796v1>**

Submitted on 22 May 2014 (v1), last revised 10 Jul 2014 (v2)

**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.

**PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE DE CHARCOT-  
MARIE-TOOTH DE TYPE 4A/2K ASSOCIEE AUX  
MUTATIONS DU GENE GDAP1**

**THESE DE DOCTORAT**

Spécialité : Neurosciences

**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE/SANTE**

**Présentée et soutenue publiquement**

**le 28 septembre 2011  
à Angers**

**par Julien CASSEREAU**

**Devant le jury ci-dessous :**

**M. Benoît FUNALOT** (rapporteur), Maître de conférences (HDR), Université de Limoges  
**M. Eric LE GUERN** (rapporteur), Maître de conférences (HDR), Université de Paris VI  
**M. Jean POUGET** (examinateur), Professeur, Université de Marseille  
**M. Frédéric DUBAS** (examinateur), Professeur, Université d'Angers  
**M. Christophe VERNY** (examinateur), Maître de conférences (HDR), Université d'Angers  
**M. Guillaume NICOLAS** (examinateur), Maître de conférences (HDR), Université d'Angers

**Directeur de thèse : M. Vincent PROCACCIO**, Professeur, Université d'Angers

**Nom et coordonnées du Laboratoire :**

IBS Laboratoire de Génétique – UMR CNRS 6214 - INSERM 771  
Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9, France

**ED 502**



**PHYSIOPATHOLOGIE DE LA MALADIE DE CHARCOT-  
MARIE-TOOTH DE TYPE 4A/2K ASSOCIEE AUX  
MUTATIONS DU GENE GDAP1**

**THESE DE DOCTORAT**

Spécialité : Neurosciences

**ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE/SANTE**

**Présentée et soutenue publiquement**

**le 28 septembre 2011  
à Angers**

**par Julien CASSEREAU**

**Devant le jury ci-dessous :**

**M. Benoît FUNALOT** (rapporteur), Maître de conférences (HDR), Université de Limoges  
**M. Eric LE GUERN** (rapporteur), Maître de conférences (HDR), Université de Paris VI  
**M. Jean POUGET** (examinateur), Professeur, Université de Marseille  
**M. Frédéric DUBAS** (examinateur), Professeur, Université d'Angers  
**M. Christophe VERNY** (examinateur), Maître de conférences (HDR), Université d'Angers  
**M. Guillaume NICOLAS** (examinateur), Maître de conférences (HDR), Université d'Angers

**Directeur de thèse : M. Vincent PROCACCIO**, Professeur, Université d'Angers

**Nom et coordonnées du Laboratoire :**

IBS Laboratoire de Génétique – UMR CNRS 6214 - INSERM 771  
Centre Hospitalier Universitaire d'Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers Cedex 9, France

**ED 502**

**AU DIRECTEUR DE THÈSE,**

**Monsieur le Professeur Vincent PROCACCIO,**

*Vous avez pris le temps de m'aider et de me conseiller pendant la réalisation de cette thèse.*

*Je vous remercie pour votre bienveillance et votre soutien.*

*Vous m'avez fait l'honneur d'accepter la direction de cette thèse, veuillez trouver ici le témoignage de mon profond respect et de ma gratitude.*

**AUX MEMBRES DU JURY,**

**Monsieur le Docteur Benoît FUNALOT,**

**Monsieur le Docteur Eric LE GUERN,**

**Monsieur le Professeur Jean POUGET,**

**Monsieur le Professeur Frédéric DUBAS,**

**Monsieur le Docteur Christophe VERNY,**

**Monsieur le Docteur Guillaume NICOLAS,**

*Vous me faites l'honneur de participer au jury en tant que rapporteurs ou examinateurs.*

*Je vous en remercie et vous témoigne de toute ma reconnaissance et de mon profond respect.*

**A Monsieur le Docteur Daniel HENRION,**

*Je vous remercie de m'avoir permis de réaliser ma thèse dans le laboratoire de Biologie Neurovasculaire et Mitochondriale Intégrée (INSERM UMR 771 – CNRS UMR 6214).*

*Veuillez trouver ici l'expression de toute ma reconnaissance.*

*Je remercie également le Professeur Pascal REYNIER et le Professeur Dominique BONNEAU de m'avoir accueilli dans leur équipe de recherche et de m'avoir ainsi permis d'acquérir une démarche scientifique.*

*Mes sincères remerciements à Arnaud Chevrollier pour sa patience, sa bonne humeur et pour son encadrement tout le long de ma thèse. Tu as été important dans ma formation scientifique et je te suis très reconnaissant du temps que tu m'as consacré en conseils, discussions et relectures d'articles ainsi que pour les bons moments passés ensemble.*

*Merci à Naïg Gueguen et Valérie Desquirit-Dumas pour leur précieuse aide et leurs encouragements dans les moments les plus stressants des oxygraphies et autres dosages de complexes.*

*Un grand merci à Marc Ferré pour m'avoir tant appris sur la bioinformatique et pour sa gentillesse.*

*Je remercie Céline Wetterwald, Jennifer Alban et Stéphanie Chupin pour leur aide technique et leur bonne humeur.*

*Je remercie Mesdames Patrizia Amati-Bonneau, Dominique Loiseau et Marie-Claire Malinge qui ont chacune participé à ce travail.*

*Je remercie les étudiantes : Claire, Virginie, Amélie, Géraldine, Layal, Florine, qui ont, grâce à leur gentillesse et leur bonne humeur, rendu ces trois années agréables.*

*Je remercie également :*

*Le Docteur Carlos Casasnovas de l'hôpital de Barcelone, et le Professeur Cyril Goizet du CHU de Bordeaux, pour leur sympathie et pour avoir participé à ce travail de recherche.*

*Je tiens à remercier l'INSERM pour m'avoir permis de réaliser ma thèse sur un Poste d'Accueil INSERM pendant 2 ans.*

*Enfin je remercie ma femme Camille et mes deux enfants adorés Marius et Bertille, mes parents et mes sœurs Hélène et Isabelle pour leur soutien tout au long de mes études.*

# *TABLE DES MATIÈRES*

<b>ABREVIATIONS</b> .....	<b>1</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>4</b>
<b>LISTE DES TABLES</b> .....	<b>6</b>
<b>AVANT-PROPOS</b> .....	<b>8</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>11</b>
<b>I. LA MITOCHONDRIE</b> .....	<b>12</b>
I.1. ORIGINE ET STRUCTURE.....	12
I.1.1. Origine .....	12
I.1.2. Structure .....	12
I.2. BIOENERGETIQUE MITOCHONDRIALE .....	15
I.2.1. les phosphorylations oxydatives .....	15
I.2.2. Le complexe I.....	18
I.2.2.1. Généralités .....	18
I.2.2.2. Structure du complexe I.....	18
I.2.2.3. Assemblage du complexe I.....	21
I.2.2.4. Les supercomplexes.....	23
I.2.3. Régulation de la phosphorylation oxydative.....	24
I.2.3.1 Régulation de la vitesse de respiration mitochondriale .....	24
I.2.3.2. Régulation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative .....	24
I.2.3.3 Phosphorylation de sous-unités des complexes OXPHOS.....	26
I.2.3.4. Régulation transcriptionnelle.....	26
I.2.3.5. Régulation par les sirtuines.....	27
I.2.4. Le stress oxydatif .....	31
I.2.5. Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose .....	32
I.3. DYNAMIQUE MITOCHONDRIALE .....	37
I.3.1 Les protéines de la fusion : mitofusines et OPA1 .....	37
I.3.1.1. Les Mitofusines (MFN1 et MFN2).....	37
I.3.1.2. Optic Atrophy 1 (OPA1).....	39
I.3.2. Les protéines de la fission : Drp1 et GDAP1 .....	42
I.3.2.1. La dynamin-related protein 1 (Drp1).....	42
I.3.2.2. Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 (GDAP1).....	42
I.3.3. Transport mitochondrial.....	45
<b>II. LA MALADIE DE CHARCOT-MARIE-TOOTH</b> .....	<b>47</b>
II.1 ASPECTS CLINIQUES ET CLASSIFICATION .....	47
II.1.1. Les formes autosomiques dominantes .....	48



II.1.1.1. Formes démyélinisantes .....	48
II.1.1.2. Formes axonales .....	49
II.1.2. Les formes autosomiques récessives .....	49
II.1.2.1. Formes démyélinisantes .....	49
II.1.2.2. Formes axonales .....	50
II.2. LA MALADIE DE CHARCOT-MARIE-TOOTH DE TYPE 4A/2K .....	52
II.2.1 Aspects génétiques et moléculaires .....	52
II.2.2. Aspects cliniques .....	52
II.2.3. Aspects physiopathologiques.....	53
<b>III. PROBLEMATIQUE DE LA THESE.....</b>	<b>56</b>
<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>57</b>
<b>I. ARTICLES N°1 ET 2 .....</b>	<b>58</b>
I.1 INTRODUCTION DES ARTICLES N°1 ET 2 .....	59
I.2. ARTICLE N°1 .....	61
I.3. ARTICLE N°2 .....	70
I.4. RESULTATS ET DISCUSSION.....	78
<b>II. ARTICLE N°3 .....</b>	<b>83</b>
II.1. INTRODUCTION .....	84
II.2. ARTICLE N°3 .....	85
II.3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	96
<b>III. ARTICLE N°4 .....</b>	<b>101</b>
III.1. INTRODUCTION.....	102
III.2. ARTICLE N°4 .....	105
III.3. RESULTATS ET DISCUSSION.....	122
<b>IV. ARTICLE N°5.....</b>	<b>124</b>
IV.1. INTRODUCTION .....	125
IV.2. ARTICLE N°5 .....	126
IV.3. RESULTATS ET DISCUSSION .....	150
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>161</b>
<b>FICHES TECHNIQUES .....</b>	<b>177</b>
<b>Fiche Technique n°1 : Culture primaire de fibroblastes cutanés.....</b>	<b>178</b>
<b>Fiche Technique n°2 : Dosage des protéines par mesure spectrophotométrique .....</b>	<b>179</b>
<b>Fiche Technique n°3 : Mesure des paramètres respiratoires sur fibroblastes perméabilisés par oxygraphie.....</b>	<b>180</b>

<b>Fiche Technique n°4</b> : Mesure de la consommation d'oxygène et de la synthèse d'ATP sur fibroblastes : détermination du rapport ATP/O.....	183
<b>Fiche Technique n°5</b> : Dosage de l'activité NADH Ubiquinone Réductase (Complexe I) sur fibroblastes .....	187
<b>Fiche Technique n°6</b> : Dosage de l'activité Succinate Ubiquinone Réductase (Complexe II) sur fibroblastes .....	190
<b>Fiche Technique n°7</b> : Dosage de l'activité Ubiquinol Cytochrome c Réductase (Complexe III) sur fibroblastes .....	193
<b>Fiche Technique n°8</b> : Dosage de l'activité Cytochrome c Oxydase (Complexe IV) sur fibroblastes .....	197
<b>Fiche Technique n°9</b> : Dosage de l'activité de l'ATP synthase (Complexe V) sur fibroblastes .....	200
<b>Fiche Technique n°10</b> : Dosage de l'activité de la Citrate synthase (CS) sur fibroblastes .....	203
<b>Fiche Technique n°11</b> : Dosage de l'activité Aconitase sur fibroblastes .....	205
<b>Fiche Technique n°12</b> : Dosage de l'activité Fumarase sur fibroblastes.....	207
<b>Fiche Technique n°13</b> : Dosage de l'isocitrate déshydrogénase sur fibroblastes.....	209
<b>Fiche Technique n°14</b> : Extraction d'ARN de fibroblastes .....	211
<b>Fiche Technique n°15</b> : Transcription inverse d'ARN de fibroblastes.....	213
<b>Fiche Technique n°16</b> : RT-PCR Quantitative .....	214
<b>Fiche Technique n°17</b> : Western Blot.....	216
<b>Fiche Technique n°18</b> : Blue Native-Page à partir de fibroblastes.....	221
<b>Fiche Technique n°19</b> : Dosage des groupements thiols sur fibroblastes .....	226
<b>Fiche Technique n°20</b> : Traitement des fibroblastes en culture par Resvératrol.....	228
<b>Fiche Technique n°21</b> : Microscopie à épifluorescence sur fibroblastes en culture.....	229
<b>Fiche Technique n°22</b> : Immunocapture du complexe I à partir de fibroblastes.....	234
<b>AUTRES PUBLICATIONS</b> .....	<b>237</b>

# *ABBREVIATIONS*

**ADN** : acide déoxyribonucléique  
**ADNmt** : acide déoxyribonucléique mitochondrial  
**ADOA ou AOD** : atrophie optique autosomique dominante  
**ADP** : adénosine diphosphate  
**AIF**: apoptosis inducing factor  
**ANT** : adenine nucleotide translocase  
**ARN** : acide ribonucléique  
**ATP** : adenosine triphosphate  
**CMT** : maladie de Charcot-Marie-Tooth  
**CMTAD, AR** : maladie de Charcot-Marie-Tooth autosomique dominante, récessive  
**CMT4A, 2K** : maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 4A, de type 2K  
**COX** : cytochrome *c* oxydase  
**CS** : citrate synthase  
**Cyt c** : Cytochrome *c*  
**DMEM** : Dulbecco's modified Eagles medium  
**DNML1** : dynamin like 1  
**DO** : densité optique  
**Drp1** : dynamin-related protein 1  
**DTNB** : 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque)  
**EDTA** : acide éthylène diaminetétracétique  
**EGR2** : early growth response 2  
**EGTA** : acide éthylène glycol-bis(2-aminoéthyléther)-N,N,N',N'-tétracétique  
**EIM** : espace intermembranaire  
**ENMG** : électroneuromyogramme  
**FADH<sub>2</sub>** : flavine adénine dinucléotide hydrogénée  
**FCCP** : carbonylcyanide-p-trifluorométhoxyphenylhydrazone  
**GARS** : glycyl tRNA synthetase  
**GDAP1** : ganglioside-induced differentiation-associated protein 1  
**GJB1** : gap junction beta 1  
**GST** : glutathion-S-transférase  
**GTP** : guanosine triphosphate  
**HGVS** : Human Genome Variation Society  
**HSPB1** : heat shock 27kDa protein 1  
**KIF1B** : kinesin family member 1B  
**LITAF** : lipopolysaccharide-induced TNF $\alpha$  factor  
**LMNA**: lamine A  
**LOVD** : Leiden Open-source Variation database  
**LSDB**: Base de données spécifique d'un gène (Locus Specific Database)  
**MELAS**: Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke  
**MFN1 et 2** : mitofusines 1 et 2  
**MPZ** : myelin protein zero  
**MTMR2** : myotubularin-related protein 2  
**NADH** : nicotinamide adénine dinucléotide hydrogéné  
**NRF1**: nuclear respiratory factor 1

**NDRG1** : N-myc downstream-regulated gene 1  
**NEFL** : neurofilament light polypeptide 68kDa  
**OPA1** : optic atrophy 1  
**OXPHOS** : phosphorylations oxydatives  
**PAGE** : polyacrylamide gel electrophoresis  
**PBS** : phosphate buffered saline  
**PCR** : quantitative polymerase chain reaction  
**PGC1** : PPAR gamma coactivateur 1  
**PKA, PKC** : protéine kinase A, protéine kinase C  
**PMP 22** : peripheral myelin protein 22  
**PPAR  $\gamma$**  : peroxysome proliferator-activated receptor  $\gamma$   
**PRX** : periaxin  
**PTP** : pore de transition de perméabilité  
**qPCR** : PCR quantitative  
**ROS** : reactive oxygen species  
**RT** : reverse transcription  
**RT-PCR** : real time - polymerase chain reaction  
**SBF2** : SET binding factor 2  
**siRNA** : small interfering RNA  
**SOD** : superoxyde dismutase  
**TEMED** : tetramethylethylenediamine  
**TFAM** : facteur de transcription mitochondriale A  
**TIM** : transporteur de la membrane interne mitochondriale  
**TMD** : domaine transmembranaire  
**TNB** : trinitrobenzène  
**TOM** : transporteur de la membrane externe mitochondriale  
**Tris** : tris(hydroxyméthyl)aminométhane  
**UCP** : uncoupling protein  
**VCM** : vitesse de conduction motrice  
**VDAC** : voltage-dependant anion channel  
**YARS** : tyrosyl-tRNA synthetase  
**YY1** : facteur de transcription Yin Yang 1

# *LISTE DES FIGURES*

<b>Figure 1:</b> Visualisations microscopiques de mitochondries de cellules fibroblastiques humaines. ....	14
<b>Figure 2:</b> Le système des phosphorylations oxydatives. ....	17
<b>Figure 3 :</b> Composition du complexe I en sous-unités. ....	19
<b>Figure 4:</b> Modules et activité du complexe I. ....	20
<b>Figure 5:</b> Modèle d'assemblage du complexe I. ....	22
<b>Figure 6:</b> Intermédiaires réduits de l'oxygène : équation de réduction monoélectronique de l'oxygène. ....	32
<b>Figure 7:</b> Séquence des modifications biochimiques et structurales d'une cellule en apoptose. ....	33
<b>Figure 8:</b> Les protéines impliquées dans le processus de fusion mitochondriale. ....	41
<b>Figure 9:</b> Les protéines impliquées dans le processus de fission mitochondriale. ....	44
<b>Figure 10 :</b> Organisation du transport axonal mitochondrial. ....	46
<b>Figure 11:</b> qPCR de GDAP1. ....	97
<b>Figure 12:</b> Hypothèses physiopathologiques des mutations du gène GDAP1 sur le métabolisme énergétique de fibroblastes de patients atteints de CMT2K (en violet) et des conséquences du déficit d'activité du complexe I (en vert). ....	156

# *LISTE DES TABLES*



**Table I :** Classification des maladies de Charcot-Marie-Tooth en fonction du mode de transmission de la maladie et des critères électrophysiologiques. Les formes liées à GDAP1 sont en caractères gras ..... 51

**Table II:** Variants présents dans la base de données dont la nomenclature a été modifiée .. 122

# *AVANT-PROPOS*

Mon travail de thèse a été réalisé au sein de l'unité mixte CNRS 6214-INSERM 771 dirigée par le Dr Henrion. Ma thèse a été réalisée sur un Poste d'Accueil Inserm sous la direction du Pr Procaccio dans l'équipe de recherche spécialisée dans les pathologies mitochondriales et héréditaires, menée par le Pr Reynier. Ce groupe de recherche s'intéresse particulièrement aux pathologies neurodégénératives liées à des anomalies bioénergétiques et de la dynamique mitochondriale, afin de mieux en comprendre les mécanismes physiopathologiques et d'aboutir à d'éventuels essais thérapeutiques utilisant des molécules ciblant la mitochondrie.

Les mitochondries sont des organites intracellulaires essentiels à la production énergétique et possédant leur propre génome, l'ADN mitochondrial (ADNmt). Ainsi, chaque cellule contient entre quelques dizaines à quelques milliers de copies d'une molécule d'ADNmt codant pour 13 sous-unités protéiques de la chaîne respiratoire. Dans les cellules eucaryotes, les mitochondries forment un réseau tubulaire plus ou moins connecté dont la morphologie dépend du type tissulaire et des conditions métaboliques. Ce réseau est en équilibre constant entre deux processus fonctionnels : la fusion et la fission. Ces mécanismes déterminent le nombre, la longueur et le diamètre des mitochondries.

Les pathologies impliquant des défauts de la conversion énergétique mitochondriale sont nombreuses et hétérogènes puisqu'elles concernent probablement plus de 300 entités clinico-biologiques. Ces pathologies, dues à des mutations de l'ADN mitochondrial ou de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales, affectent principalement les organes à fort besoin énergétique comme le système nerveux, les muscles ou les organes neurosensoriels. Des dysfonctions mitochondriales ont été retrouvées dans de nombreuses pathologies neurodégénératives incluant la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson, la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique, l'épilepsie et des pathologies psychiatriques tels que les troubles bipolaires. Les mécanismes moléculaires impliqués dans le processus de neurodégénérescence ne sont pas encore bien élucidés, mais il semblerait que le contrôle de la morphologie et de la plasticité mitochondriale joue un rôle important. En effet, des anomalies de la dynamique mitochondriale ont été identifiées dans la plupart des pathologies neurodégénératives. Les mutations des gènes *OPA1* et *MFN2*, impliqués dans le processus de fusion mitochondriale, sont responsables respectivement d'une neuropathie optique, l'atrophie optique dominante (ADOA), et d'une neuropathie périphérique, la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A). Plusieurs études ont montré que ces deux protéines majeures de la dynamique mitochondriale étaient aussi impliquées dans la bioénergétique mitochondriale.

L'objectif principal de mon travail a été d'étudier le métabolisme énergétique mitochondrial de cellules fibroblastiques issues de patients atteints d'une maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 4A et 2K (CMT4A/2K) par mutations du gène *ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 (GDAP1)*. Le produit de ce gène est une protéine de la membrane externe mitochondriale impliquée dans le processus de fission mitochondriale.

Ce travail a été réalisé grâce à une étroite collaboration avec le Centre de référence national sur les maladies neurogénétiques coordonné par le Pr Dominique Bonneau et le Dr Christophe Verny, et avec le Département de Biochimie et Génétique du CHU qui assure le diagnostic Biochimique (Dr Naïg Gueguen) et moléculaire (Dr Patrizia Amati- Bonneau, Dr Arnaud Chevrollier et Dr Marie-Claire Malinge) de ces pathologies. Une collaboration avec le Pr Cyril Goizet du Département de Génétique du CHU de Bordeaux et une collaboration avec le Dr Carlos Casasnovas du Département de Neurologie de l'Hôpital de Barcelone, nous ont permis d'obtenir des cellules fibroblastiques de patients porteurs de différentes mutations du gène *GDAP1*. L'étude du métabolisme énergétique de ces cellules a montré une altération bioénergétique importante et l'étude des mécanismes responsables de cette altération bioénergétique a permis de mettre en évidence de nouvelles pistes pour la compréhension de la physiopathologie de cette neuropathie héréditaire.

# *INTRODUCTION*

# I. La mitochondrie

## I.1. Origine et structure

### *I.1.1. Origine*

Selon la théorie endosymbiotique, les mitochondries proviennent d'un évènement de symbiose entre une eubactérie et une cellule eucaryote primitive (Margulis, 1975). C'est après la découverte de l'ADN mitochondrial (ADNmt) en 1960, que l'idée de l'origine bactérienne de la mitochondrie a été acceptée. Au cours de l'évolution, la majorité des gènes  $\alpha$ -protéobactériens de la mitochondrie primitive a été soit perdue soit transférée vers le noyau. L'ADNmt se présente sous forme circulaire double brin et a une taille de 16 569 paires de bases (pb) chez l'homme. Chaque cellule contient quelques dizaines à quelques milliers de molécules d'ADNmt. L'ADNmt code pour :

- 13 sous-unités protéiques, qui avec des sous-unités codées par le génome nucléaire, participent à la formation des complexes de la phosphorylation oxydative;
- les acides ribonucléiques ribosomiques (ARNr) 16S et 12S et un ensemble de gènes codant des acides ribonucléiques de transfert (ARNt). L'essentiel des composants mitochondriaux est codé par l'ADN nucléaire et transportés dans les organites grâce à un système complexe faisant intervenir des séquences d'adressage spécifiques et des complexes de transport transmembranaire.

### *I.1.2. Structure*

La structure mitochondriale est caractérisée par une bicouche phospholipidique, une externe et une interne, délimitant l'espace intermembranaire, la matrice et les crêtes (compartiment interne formé par les replis de la membrane interne) (Figure 1A).

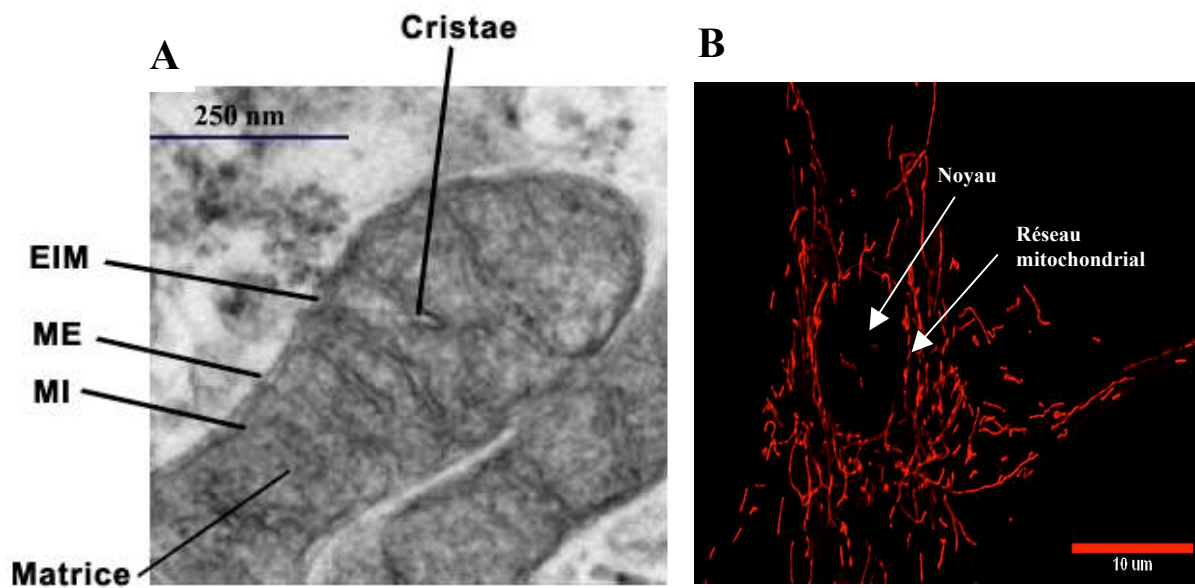
La membrane externe constitue une barrière semi-perméable aux ions et aux petites molécules, ce qui fait que l'espace inter-membranaire a une composition proche de celle du cytoplasme. Elle contient de nombreux pores transmembranaires appelés porines ou VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel) qui forment des canaux aqueux. De ce fait, elle possède une perméabilité passive aux molécules de poids moléculaire inférieur à 10 kDa ce qui permet le passage de la plupart des anions, des cations, des acides gras, du pyruvate et des

nucléotides. Cette membrane contient également des translocases (TOM : Translocase Outer Membrane) qui permettent le transport spécifique et régulé des grosses protéines mitochondriales.

La membrane interne possède une quantité importante de cardiolipines et est pauvre en triglycérides. Ainsi, la membrane interne est beaucoup moins perméable que la membrane externe et forme une barrière physique imperméable aux petites molécules. Le passage des molécules nécessite la présence de transporteurs tels que l'ANT (qui échange l'ATP mitochondrial en échange d'ADP cytosolique), le co-transporteur de phosphate inorganique/proton, le symport pyruvate/proton, la navette du glycérol-3-phosphate, la navette malate/aspartate, le transporteur du citrate, la carnitine-acylcarnitine translocase. Les protéines sont importées grâce à un système de translocases, les TIM (Translocase Inner Membrane).

Ces propriétés permettent également de maintenir le gradient de protons créé par la chaîne respiratoire de part et d'autre de la membrane interne. La membrane interne forme des invaginations dans l'espace matriciel formant les crêtes (cristae) qui permettent d'augmenter la surface de la membrane et donc la capacité et l'efficacité des phosphorylations oxydatives. C'est au niveau des membranes mitochondriales que l'énergie fournie par les molécules organiques est transférée sous forme d'ATP, la molécule énergétique principale utilisable par la cellule. Quatre complexes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase assurent les phosphorylations oxydatives (OXPHOS) au niveau de la membrane interne

Dans les cellules eucaryotes, les mitochondries forment un réseau tubulaire plus ou moins connecté (Figure 1B) dont la morphologie dépend du type cellulaire et des conditions métaboliques (Griparic and van der Bliek, 2001). Ce réseau est en équilibre constant entre deux processus fonctionnels : la fusion et la fission (Karbowski and Youle, 2003). Ces mécanismes déterminent le nombre, la longueur et le diamètre des mitochondries.



**Figure 1: Visualisations microscopiques de mitochondries de cellules fibroblastiques humaines.**

**A.** Mitochondries visualisées en microscopie électronique à transmission (avec la permission du Pr Vallat). EIM : espace intermembranaire ; ME : membrane externe ; MI : membrane interne

**B.** Réseau mitochondrial en microscopie optique à épifluorescence. Les mitochondries sont colorées par le MitoTracker Red (Chevrollier et Cassereau, communication personnelle)



## I.2. Bioénergétique mitochondriale

### I.2.1. les phosphorylations oxydatives

Les 13 sous-unités protéiques codées par l'ADNmt ne représentent que 16% de la totalité des constituants de ce système OXPHOS. Ainsi, 76 sous-unités décrites aujourd'hui sont codées par le génome nucléaire et transférées à la mitochondrie grâce à une séquence d'adressage précisant leur localisation mitochondriale. Le système OXPHOS est constitué d'une chaîne d'oxydoréduction et d'un complexe de phosphorylation (Figure 2) :

- **Une chaîne d'oxydoréduction** transporte les protons et les électrons des coenzymes réduits vers l'oxygène, constituée de 4 complexes enzymatiques enchâssés dans la membrane interne mitochondriale et de deux transporteurs d'électrons mobiles : l'ubiquinone (ou coenzyme Q) et le cytochrome *c*. Les 4 complexes enzymatiques sont :

- NADH - coenzyme Q réductase (complexe I)

- Succinate - coenzyme Q réductase (complexe II)

- Coenzyme Q – cytochrome réductase (complexe III)

- Cytochrome *c* oxydase (complexe IV)

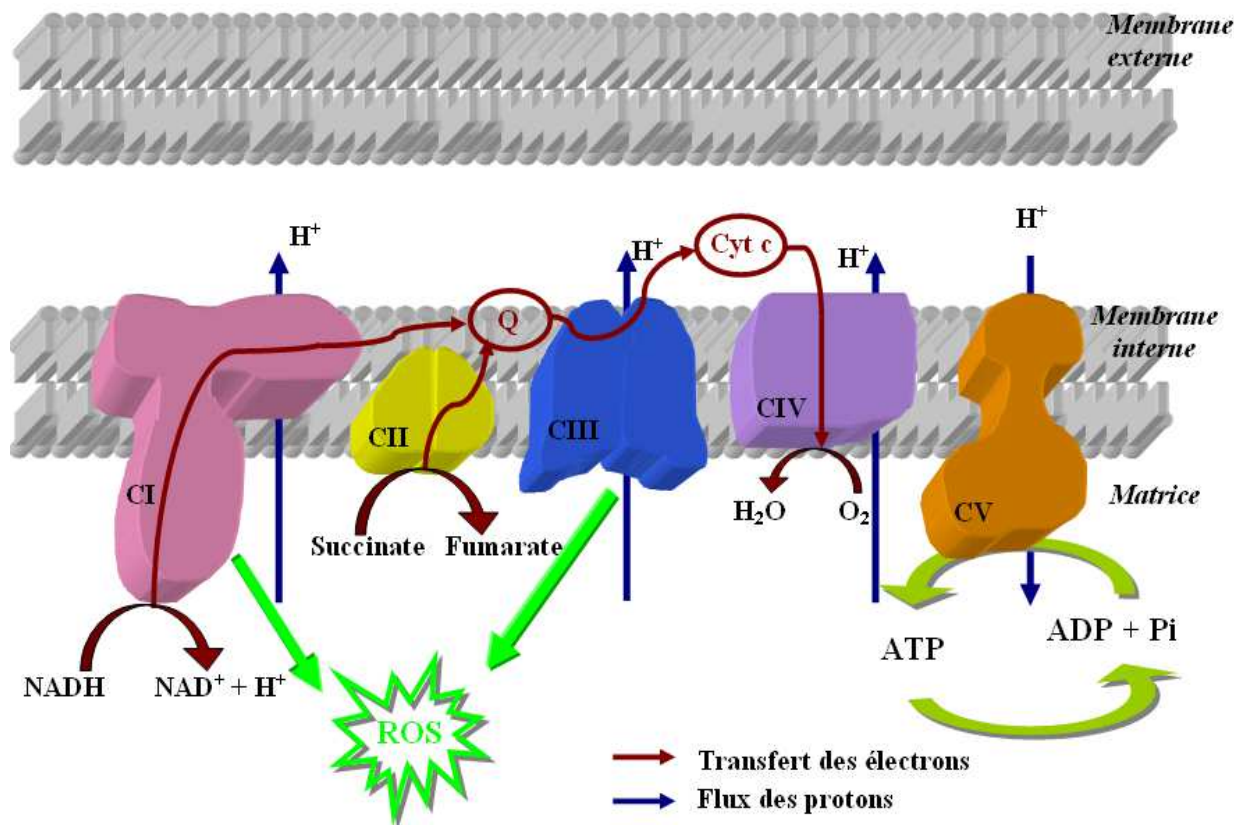
- **Un complexe de phosphorylation**, l'ATP synthase, ou complexe V, assure la synthèse d'ATP à partir de l'ADP.

Les électrons entrant dans la chaîne d'oxydoréduction proviennent des coenzymes réduits (NADH + H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>) issus de la glycolyse, de la β-oxydation des acides gras, du catabolisme des acides aminés ou du cycle de Krebs, qui est le point final et commun du catabolisme des glucides, lipides et acides aminés car tous ces catabolismes aboutissent à la formation d'acétyl-coenzyme A. Le cycle de Krebs est composé de 8 étapes, chacune étant catalysée par une enzyme spécifique. Au cours du cycle sont produites, 2 moles de CO<sub>2</sub>, 3 moles de NADH, H<sup>+</sup>, 1 mole de CoQH<sub>2</sub> et 1 mole de GTP. Au niveau de la chaîne respiratoire, les coenzymes réduits vont alors céder leurs électrons à un système de transporteurs qui, par une cascade de réactions d'oxydo-réduction, échangent ces électrons jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène moléculaire. La chaîne respiratoire va récupérer l'énergie stockée dans la NADH et la FADH<sub>2</sub> pour créer un gradient de protons. C'est ce gradient de protons qui fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP.

Le complexe I, est le plus gros complexe enzymatique du système OXPHOS (45 sous-unités constitutives associées à des protéines d'assemblage). Le complexe I oxyde le NADH + H<sup>+</sup> ce qui revient à prendre deux électrons au cofacteur. L'énergie de cette oxydoréduction permet

d'éjecter quatre protons hors de la matrice mitochondriale. Le complexe I retrouve ensuite son état antérieur en transmettant l'électron au coenzyme Q ou ubiquinone. Ces électrons cheminent du complexe I vers le complexe III via l'ubiquinone puis passent, via le cytochrome *c*, du complexe III au complexe IV où ils participent à la réduction de l'oxygène en eau. Le complexe II oxyde le FADH<sub>2</sub> en FAD. Ce complexe oxyde le succinate en fumarate (réaction du cycle de Krebs), et les électrons récupérés servent à réduire le FAD en FADH<sub>2</sub>. Le complexe II est commun au cycle de Krebs et à la chaîne respiratoire. Comme pour le complexe I, les électrons cheminent de façon identique à ceux fournis par le NADH. Au cours de ce transfert d'électrons, des protons sont expulsés de la matrice vers l'espace intermembranaire (au niveau des complexes I, III et IV) ce qui crée un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne imperméable aux protons, et une force protomotrice contenant l'énergie d'oxydation. Ce gradient électrochimique fournit l'énergie nécessaire aux protons pour retourner dans la matrice via l'ATP synthase et ainsi permettre la phosphorylation de l'ADP en ATP. Il y a donc un couplage chimio-osmotique entre la respiration et la phosphorylation (Mitchell, 1961). Ce couplage peut être diminué soit par modification de la force protomotrice soit par baisse d'efficacité des pompes à protons. L'efficacité de la chaîne respiratoire est évaluée par le rapport entre la production d'ATP et l'oxygène consommé (ATP/O).

Une fois synthétisé, l'ATP matriciel est échangé contre l'ADP cytosolique par le transporteur des nucléotides adényliques (ANT). Ce dernier, localisé dans la membrane interne mitochondriale, est composé de deux monomères de 30 kDa chacun. Il existe trois isoformes d'ANT codées par trois gènes nucléaires distincts. L'isoforme ANT1 est tissu-spécifique et est majoritairement exprimée dans les muscles squelettiques et le coeur, l'ANT2 est exprimée dans les cellules en forte prolifération tandis que l'ANT3 est ubiquitaire (Stepien et al., 1992).



**Figure 2: Le système des phosphorylations oxydatives.**

Il est constitué de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexes I à IV) et du complexe de phosphorylation, l'ATP synthase (complexe V). L'entrée des électrons se fait par les complexes I et II. Ce transport d'électrons s'accompagne, au niveau des complexes I, III et IV, d'un pompage de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire à l'origine de la formation d'un gradient de protons utilisé par l'ATP synthase pour synthétiser l'ATP. Les radicaux libres (ROS) sont essentiellement produits par la chaîne respiratoire au niveau des complexes I et III.

## ***I.2.2. Le complexe I***

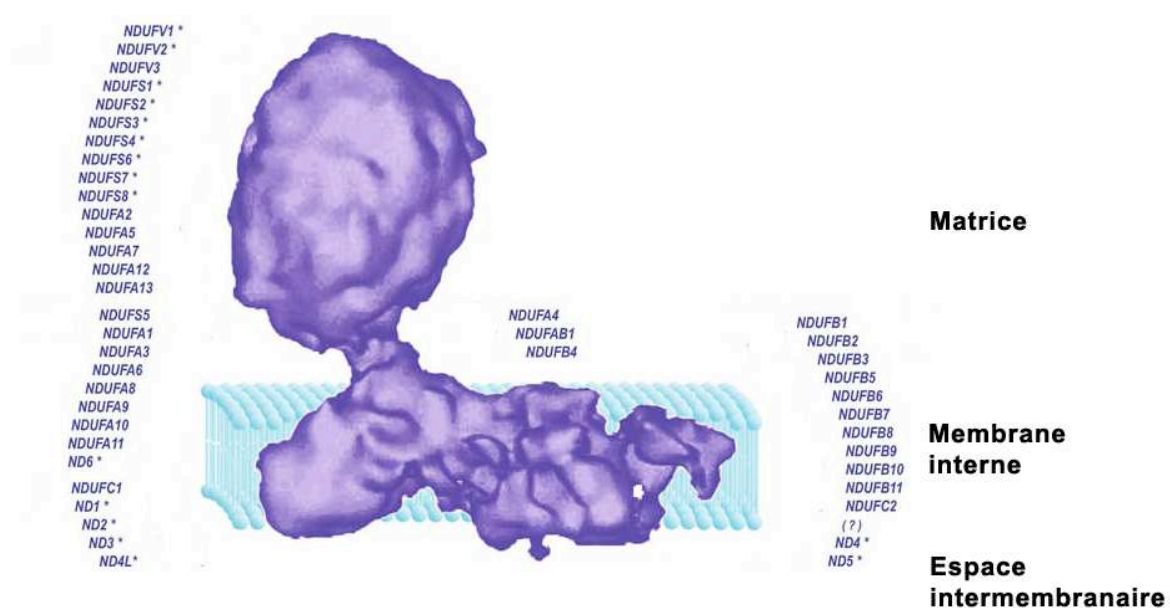
### **I.2.2.1. Généralités**

Les déficits isolés du complexe I sont la cause la plus fréquente de défaut de la chaîne respiratoire. Les patients porteurs d'un déficit du complexe I présentent différentes manifestations cliniques pouvant impliquer un ou plusieurs tissus. Par exemple, certaines mutations de l'ADNmt codant pour des sous-unités du complexe I conduisent à un déficit enzymatique du complexe I (Chevrollier et al., 2008). Ces mutations sont associées à la Neuropathie Optique Héritaire de Leber (LHON), caractérisée par une perte rapide et sans douleur de la vision centrale et qui n'affecte que le nerf optique. Inversement, d'autres mutations de l'ADNmt codant pour des sous-unités du complexe I peuvent impliquer différents organes comme dans le cas du syndrome MELAS associant une Myopathie mitochondriale, une Encéphalopathie, une Acidose Lactique et des tableaux neurologiques aigus ressemblant à des accidents vasculaires cérébraux. Certains défauts du complexe I sont également associés à des maladies infantiles mortelles telles que le syndrome de Leigh ou encéphalomyopathie nécrosante subaiguë, caractérisée par des lésions neuropathologiques associant en particulier une atteinte du tronc cérébral et des ganglions de la base. Cliniquement on retrouve un retard du développement, une atteinte pyramidale et/ou extrapyramidale, un nystagmus, des troubles de la commande ventilatoire, une ophtalmoplégie et une neuropathie périphérique. Cette maladie peut se manifester par une combinaison d'autres caractéristiques cliniques telles qu'une cardiomyopathie hypertrophique, une hypotonie, une ataxie et une surdité. La cause de cette hétérogénéité phénotypique n'est pas bien comprise, mais pourrait provenir de différentes mutations qui exerceraient des effets variables sur la stabilité, l'assemblage et l'activité du complexe I.

### **I.2.2.2. Structure du complexe I**

Le complexe I se compose de 45 sous-unités différentes qui s'assemblent pour former une structure d'environ 1 MDa (Figure 3) (Janssen et al., 2006). L'ADN mitochondrial code pour 7 sous-unités de ce complexe (Carroll et al., 2006). Après leur traduction, les 38 autres sous-unités codées par le génome nucléaire sont importées dans l'organite par la machinerie d'importation. Le complexe I est constitué de deux domaines majeurs : un domaine hydrophile et un domaine hydrophobe. Le domaine hydrophile, codé par le génome nucléaire, contient le site de liaison du NADH, la flavine mononucléotide et des centres fer/soufre constituant le

centre catalytique de l'enzyme. Le domaine hydrophobe est constitué des 7 sous-unités NADH déshydrogénase (ND) codées par le génome mitochondrial ainsi que d'une sélection de sous-unités codées par le génome nucléaire qui contient le site de réduction des quinones et la machinerie de pompage des protons. La roténone, un inhibiteur du complexe I, agit au niveau du domaine hydrophobe du complexe, vraisemblablement au niveau du site de fixation de l'ubiquinone (Degli Esposti, 1998).



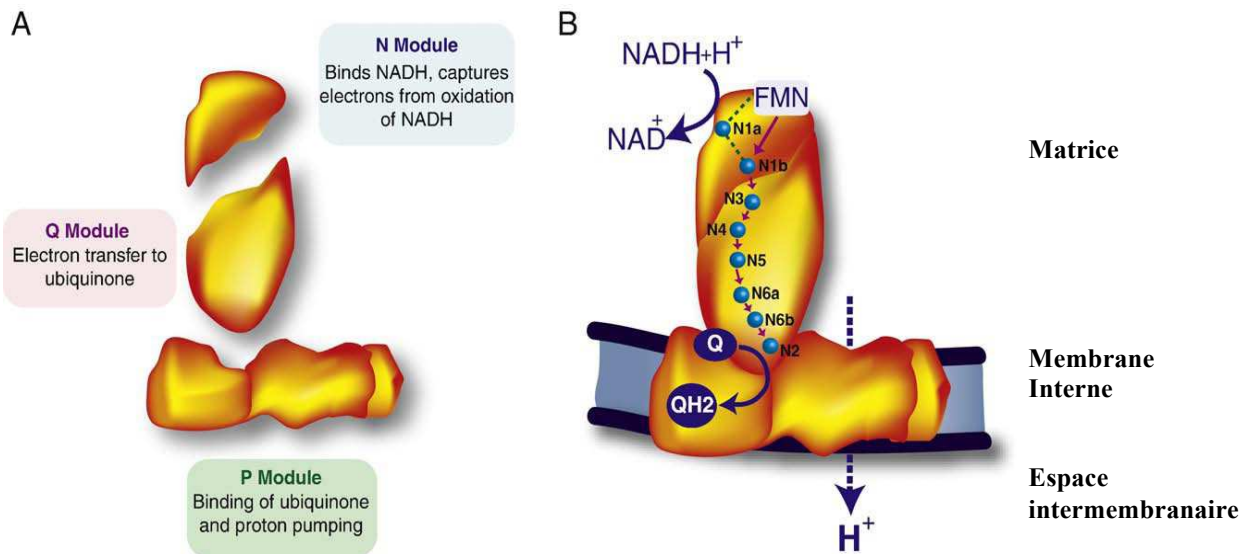
**Figure 3 : Composition du complexe I en sous-unités.**

La nomenclature des sous-unités est écrite en bleu foncé.

Les sous-unités qui ont été rapportées comme pouvant être porteuses de mutations pathogènes responsables d'un déficit du complexe I comportent un \*.

(D'après Janssen et al., 2006)

Des homologues du complexe I des mammifères sont présents dans les bactéries et les plantes. Le complexe I d'E. coli comprend 14 sous-unités (Gabaldon et al., 2005). Ce complexe bactérien de 550 kDa peut être décomposé en trois modules fonctionnels : le module d'entrée d'électrons (Module N), le module de sortie d'électrons (Module Q), et le module de la translocation des protons (Module P), très conservés sur le plan évolutif (Friedrich, 2001). Les modules fonctionnels du complexe I sont représentés dans la Figure 4. Le module N lie et oxyde le NADH entraînant la libération des électrons qui sont transférés via la flavine mononucléotide (FMN) et un ensemble de centres Fe-S. Le module Q reçoit les électrons et les transfère au coenzyme Q (ou ubiquinone). Alors que les modules N et Q sont situés dans la matrice mitochondriale (ou le cytoplasme bactérien), le module P est enchâssé dans la membrane et serait impliqué dans le pompage des protons (Lazarou et al., 2009).



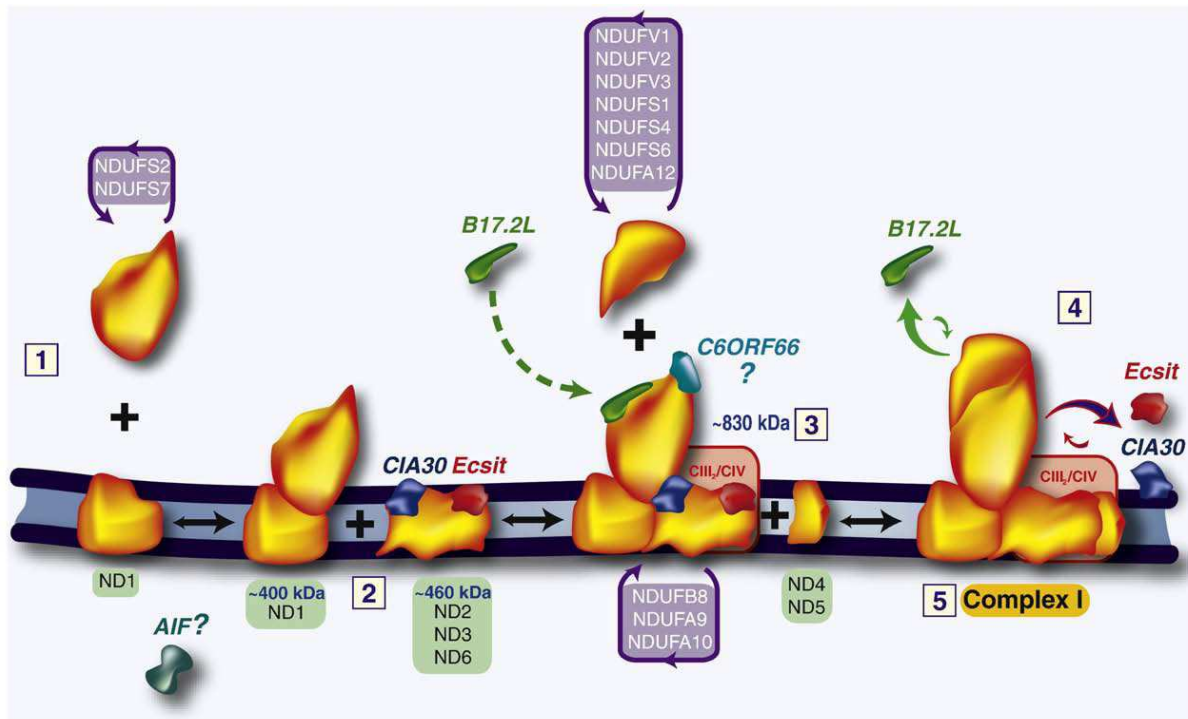
**Figure 4: Modules et activité du complexe I.**

A. Le complexe I est composé de trois modules fonctionnels très conservés; le module d'entrée des électrons (N Module), module de sortie des électrons (Q Module), et le module de translocation des protons (P Module).

B. Schéma illustrant le transfert des électrons et le pompage des protons du complexe I. Les électrons provenant de l'oxydation du NADH sont transférés, via la flavine mononucléotide (FMN) et une série de groupes fer-soufre (Fe-S) (cercles bleus), à l'ubiquinone (Q), formant l'ubiquinol (QH<sub>2</sub>). (D'après Lazarou et al., 2009)

### **I.2.2.3. Assemblage du complexe I**

De récents travaux ont permis de mieux comprendre l'assemblage du complexe I chez l'homme (Antonicka et al., 2003; Lazarou et al., 2007; Vogel et al., 2007). Certaines études ont utilisé des lignées cellulaires de patients présentant des mutations dans les sous-unités du complexe I ou dans des facteurs d'assemblage du complexe I. En se basant sur les résultats de ces études, Lazarou et al. ont proposé un modèle d'assemblage du complexe I (Figure 5) (Lazarou et al., 2009). Dans ce modèle, le premier sous-ensemble à se former appartient au complexe Q et est composé des sous-unités NDUFS2 et NDUFS7. Ce sous-ensemble est ancré à la membrane interne par l'intermédiaire de la sous-unité ND1, probablement associée à d'autres sous-unités formant ainsi un sous-complexe de ~ 400 kDa. Les facteurs d'assemblage CIA30 et Ecsit, sont impliqués dans l'assemblage d'un sous-complexe de ~ 460 kDa du module P contenant les sous-unités ND2, ND3 et ND6. Ces deux sous-complexes de 400 kDa et 460 kDa se combinent pour former un complexe de 830 kDa avec les facteurs d'assemblage B17.2L et peut-être C6ORF66. Ce complexe intermédiaire entre dans la composition d'un super-complexe en se combinant avec les complexes III et IV. D'autres sous-unités codées par l'ADN nucléaire telles que NDUFB8, NDUFA9 et NDUFA10 pourraient être ajoutées à ce stade. Les dernières étapes d'assemblage du complexe I consisteraient en l'addition du module M, encore appelé « plafond », constitué des sous-unités NDUFV1, NDUFV2, NDUFV3, NDUFS1, NDUFS4, NDUFS6 et NDUFA12, et en l'achèvement du module P avec l'ajout de ND4 et ND5. L'assemblage de ces sous-unités est concomitant avec la sortie de CIA30/Ecsit et B17.2L formant ainsi l'holoenzyme.



**Figure 5: Modèle d'assemblage du complexe I**

**1** Le premier sous-ensemble se compose des sous-unités NDUFS2 et NDUFS7 et appartient au complexe Q. Ce sous-ensemble est ancré à la membrane interne par l'intermédiaire de la sous-unité ND1 formant ainsi un complexe de 400kDa. **2** Les facteurs d'assemblage CIA30 et Ecsit, impliqués dans l'assemblage d'un sous-complexe de ~ 460 kDa du module P, contiennent les sous-unités ND2, ND3 et ND6. **3** Les deux sous-complexes de 400 kDa et 460 kDa forment un complexe de 830 kDa avec les facteurs d'assemblage B17.2L et C6ORF66. Ce complexe intermédiaire entre dans la composition d'un super-complexe en se combinant avec les complexes III et IV. Les sous-unités NDUFB8, NDUFA9 et NDUFA10 sont ajoutées à ce stade. **4** Les dernières étapes d'assemblage du complexe I consistent en l'addition du module M constitué des sous-unités NDUFV1, NDUFV2, NDUFV3, NDUFS1, NDUFS4, NDUFS6 et NDUFA12, et en l'achèvement du module P avec l'ajout de ND4 et ND5. **5** L'assemblage de ces sous-unités est concomitant avec la sortie de CIA30/Ecsit et B17.2L formant ainsi l'holoenzyme. Le rôle de l' *Apoptosis inducing factor* (AIF) dans le processus d'assemblage est inconnu et nécessite des études supplémentaires. (D'après Lazarou et al., 2009).



#### I.2.2.4. Les supercomplexes

L'organisation supramoléculaire des complexes OXPHOS en supercomplexes semble bien établie dans divers organismes tels que les bactéries (Stroh et al., 2004), les eucaryotes inférieurs et les mammifères (Schagger and Pfeiffer, 2000). En effet, des mutations de certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire sont capables d'affecter la stabilité d'autres complexes (Acin-Perez et al., 2004). Les complexes I, III, IV et V ont été retrouvés dans ces « supercomplexes » sous quatre formes différentes. Seul le complexe II ne ferait partie d'aucun supercomplexe décrit à l'heure actuelle.

Le supercomplexe I+III<sub>2</sub>, constitué d'un dimère du complexe III et de la partie membranaire du complexe I, a été caractérisé chez la plante *Arabidopsis thaliana* (Dudkina et al., 2005).

Le supercomplexe III<sub>2</sub>+IV<sub>1-2</sub> mis en évidence chez la levure est composé d'un dimère du complexe III associé à un ou deux monomères du complexe IV (Cruciat et al., 2000).

Le plus gros supercomplexe I+III<sub>2</sub>+IV<sub>1-4</sub> résulte de l'association de la partie membranaire du complexe I, d'un dimère du complexe III et du complexe IV. Ce supercomplexe est aussi appelé « respirasome » (Schagger and Pfeiffer, 2000).

Enfin, le dimère d'ATP synthase est un supercomplexe V<sub>2</sub> participant à la structure des crêtes mitochondriales (Giraud et al., 2002).

La formation de ces supercomplexes est essentielle pour l'assemblage et / ou la stabilité du complexe I. Par exemple, il a été montré une diminution de la quantité de complexe I lié à la membrane chez des mutants de *Paracoccus denitrificans* dépourvus de complexes III et IV, ce qui suggère une diminution de la stabilité du complexe I lorsqu'il n'est pas organisé en supercomplexes (Stroh et al., 2004). De plus, ces associations ont un rôle fonctionnel important en permettant d'augmenter la vitesse de transfert des électrons et en augmentant la capacité d'insertion des complexes dans la membrane interne (Boekema and Braun, 2007).

### ***1.2.3. Régulation de la phosphorylation oxydative***

La phosphorylation oxydative est régulée au niveau de sa vitesse de synthèse d'ATP et au niveau de son efficacité. Le fonctionnement des complexes OXPHOS est également régulé par des régulations telles que des phosphorylations/déphosphorylations (Kadenbach, 2003). La chaîne respiratoire mitochondriale peut également être la cible de modifications transcriptionnelles à plus long terme.

#### **1.2.3.1 Régulation de la vitesse de respiration mitochondriale**

Des travaux sur mitochondries isolées ont mis en évidence une augmentation de la respiration mitochondriale en présence d'un système de régénération de l'ADP (Lardy and Wellman, 1952) et par (Chance and Williams, 1956). La vitesse de consommation d'oxygène dépend donc de la disponibilité en ADP et donc de l'utilisation de l'ATP. Ce contrôle respiratoire permet aux mitochondries d'adapter leur fonctionnement à la demande énergétique cellulaire.

En plus du taux d'ADP, d'autres substrats de la chaîne respiratoire exercent un contrôle sur la respiration. Ainsi le ratio  $\text{NADH/NAD}^+$  et la concentration en oxygène ont été montrés comme étant impliqués dans ce contrôle de la vitesse de respiration mitochondriale (Erecinska and Wilson, 1982).

#### **1.2.3.2. Régulation de l'efficacité de la phosphorylation oxydative**

Il existe un couplage chimio-osmotique par la force protomotrice entre la respiration et la phosphorylation mitochondriale (Mitchell, 1961). Ce couplage détermine l'efficacité de la phosphorylation oxydative appréciée par la mesure du rapport du taux de synthèse d'ATP par la quantité d'oxygène consommée (ATP/O). Ce paramètre peut varier soit par modification de la force protomotrice, appelée aussi « découplage extrinsèque », soit par modification de l'efficacité de pompage des protons, appelée « découplage intrinsèque ».

**Le découplage extrinsèque.** Le découplage extrinsèque est le résultat d'une augmentation de la perméabilité de la membrane interne aux protons ou aux cations, favorisant ainsi une dissipation du gradient de protons. Une partie des protons retourne dans la matrice mitochondriale sans passer par l'ATP synthase et ne participe donc pas à la synthèse d'ATP.

Pour compenser cette perte de protons, la vitesse de consommation en oxygène augmente afin de maintenir la force protomotrice.

Il existe une fuite de protons basale, physiologique, liée aux propriétés physicochimiques de la membrane interne. L'augmentation de la quantité de cardiolipines aggraverait cette fuite basale (Bobyleva et al., 1997). La surface de la membrane mitochondriale interne aurait également une influence sur l'intensité de la fuite (Brand et al., 1992).

La fuite de protons inductible est liée à la présence dans la membrane interne de protéines catalysant la translocation de protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale appelées les UCP (uncoupling protein). Il existe 5 isoformes connues d'UCP (UCP1 à UCP5). Le rôle exact de ces protéines n'est pas parfaitement élucidé mais il semblerait qu'elles pourraient agir comme des transporteurs de protons (Jaburek et al., 1999). De nombreuses études ont montré un rôle de ces protéines dans la régulation de la production de ROS. En effet, un découplage léger diminuerait de façon importante la production de ROS. Les ROS fonctionneraient par rétrocontrôle négatif en activant les UCP2 et 3 qui en retour limiteraient leur production (Brand et al., 2004).

D'autres protéines ont un rôle dans ce découplage extrinsèque. Il a été montré que l'ANT était impliquée dans la fuite basale dans les mitochondries du tissu adipeux brun et certains auteurs ont proposé un modèle selon lequel l'ANT1 serait responsable de cette fuite basale et l'ANT2 serait plutôt impliquée dans la partie de la fuite induite par les acides gras (Shabalina et al., 2006). La fuite de protons inductible par les acides gras a également été mise en évidence pour le transporteur glutamate/aspartate (Wojtczak and Wieckowski, 1999).

**Le découplage intrinsèque.** Le découplage intrinsèque est le résultat d'une diminution de l'efficacité des pompes à protons. Ceci implique une diminution de la stoechiométrie proton/électron ( $H^+/e^-$ ), c'est-à-dire une diminution du nombre de protons pompés par électron transféré conduisant ainsi à une augmentation de la respiration pour le maintien d'un même gradient de protons. Il semble que, *in vivo*, seul le complexe IV soit impliqué dans ce type de découplage (Papa et al., 1991).

Le découplage intrinsèque affecte également la stoechiométrie protons/ATP ( $H^+/ATP$ ), c'est-à-dire que pour une même consommation d'oxygène, l'efficacité de phosphorylation est diminuée, puisqu'il faut un retour plus important de protons pour synthétiser la même quantité d'ATP. Ainsi, ce découplage se fait au niveau de l'ATP synthase et n'affecte pas la vitesse de respiration mitochondriale mais diminue la quantité d'ATP synthétisée pour un flux de protons donné.

### **I.2.3.3 Phosphorylation de sous-unités des complexes OXPHOS.**

De nombreuses kinases et phosphatases sont retrouvées dans la mitochondrie. Il s'agit de tyrosines kinases, de PKA, de PKC, d'AKT (Horbinski and Chu, 2005) et de la pyruvate déshydrogénase kinase. Le complexe pyruvate deshydrogénase qui fournit une partie des équivalents réduits sous forme de NADH, possède trois sites de phosphorylation au niveau de résidus sérine. En cas de phosphorylation de ces résidus par la pyruvate déshydrogénase kinase, le complexe devient inactif.

Certaines sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire sont des phosphoprotéines (Pagliarini and Dixon, 2006) Il a par exemple été montré que la sous-unité NDUFS4 du complexe I pouvait être activée par phosphorylation par la protéine PKA et désactivée par déphosphorylation par une phosphatase calcium dépendante (Papa, 2002). Le complexe IV est également la cible d'une phosphorylation par PKA au niveau d'un résidu sérine en position 441 et sur d'un résidu tyrosine en position 304 (Lee et al., 2002; Lee et al., 2005). Enfin, l'ATP synthase peut également être la cible de phosphorylations sur différents sites (Hojlund et al., 2003).

### **I.2.3.4. Régulation transcriptionnelle**

Le génome mitochondrial ne code que pour une partie des protéines de la chaîne respiratoire, les autres protéines mitochondriales étant codées par le génome nucléaire. Dès lors, l'intervention de facteurs régulateurs codés par le génome nucléaire est importante afin de permettre d'une part la transcription du génome mitochondrial et d'autre part l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales (Scarpulla, 2006). Il s'agit de facteurs de transcription gouvernant l'expression du génome mitochondrial : l'ARN polymérase mitochondriale, le facteur de transcription et de maintenance de l'ADN mitochondrial : TFAM, des facteurs de transcription : TFB1M et TFB2M, un facteur de terminaison de transcription : mTERF, et de facteurs nucléaires contrôlant l'expression des gènes de la chaîne respiratoire codés par le génome nucléaire tels que les facteurs de transcription NRF1 (nuclear respiratory factor 1) et NRF2 (nuclear respiratory factor 2), et différents coactivateurs tels que PGC-1 (Proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) coactivator 1 $\alpha$ ) jouant un rôle essentiel dans la régulation du programme de biogenèse mitochondriale. NRF-1 active la transcription de gènes nucléaires codant pour des protéines des quatre complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATPase. Il contrôle aussi l'expression du facteur de transcription mitochondriale (TFAM) (Virbasius and Scarpulla, 1994) et de la RNase MRP

(mitochondrial RNA processing) impliqués dans la transcription et la réplication de l'ADNmt, permettant ainsi une expression coordonnée des gènes nucléaires et mitochondriaux afin d'assurer un fonctionnement mitochondrial correct. NRF-1 est un acteur majeur de la coordination d'expression des gènes mitochondriaux et nucléaires de protéines mitochondriales. NRF-2 est un facteur de transcription de nombreux gènes de la chaîne respiratoire ainsi que d'autres gènes impliqués dans d'autres fonctions mitochondriales. NRF-1 et NRF-2 sont eux-mêmes régulés par des co-activateurs transcriptionnels tels que PGC1 $\alpha$ .

### **I.2.3.5. Régulation par les sirtuines**

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études ont montré l'implication de la famille des sirtuines dans la régulation du métabolisme énergétique. Le premier membre de la famille des sirtuines mis en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae* est la protéine Sir2 (silent information regulator 2), une histone déacétylase dépendante du NAD<sup>+</sup> (Imai et al., 2000; Landry et al., 2000; Smith et al., 2000).

Les mammifères contiennent 7 sirtuines (SIRT1-7) qui sont caractérisées par un domaine central évolutivement conservé (Frye, 1999). Ce domaine contient l'activité catalytique et le site impliqué dans la liaison au NAD<sup>+</sup>. Toutes les sirtuines présentent deux grandes activités enzymatiques : une activité déacétylase NAD<sup>+</sup>-dépendante et une activité ADP-ribosyltransférase. Les sirtuines sont localisées dans différents compartiments sub-cellulaires. SIRT1, SIRT6 et SIRT7 se trouvent dans le noyau, SIRT2 est principalement cytosolique et SIRT3, SIRT4 et SIRT5 se trouvent dans les mitochondries.

Les sirtuines déacétylases catalysent une réaction couplant la déacétylation d'une lysine à l'hydrolyse du NAD<sup>+</sup>. Le fait que le fonctionnement des sirtuines soit dépendant du NAD<sup>+</sup> suggère que cette activité enzymatique est directement liée au statut énergétique cellulaire (Bitterman et al., 2002; Lin et al., 2000; Lin et al., 2002). Les niveaux de NAD<sup>+</sup> et NADH sont intimement liés à la production d'énergie mitochondriale et régulent l'activité des sirtuines mitochondriales. Contrairement à NAD<sup>+</sup>, le NADH n'est pas un co-substrat des sirtuines. En effet, un changement du ratio NAD<sup>+</sup>/NADH peut changer l'état redox de la cellule et modifier l'activité des sirtuines (Canto et al., 2009). De plus, il a été montré que le 2-déoxyglucose (2-DG), un inhibiteur de la glycolyse, régule positivement l'expression de SIRT1 en réduisant la liaison du répresseur transcriptionnel HIC1 (hypermethylated in cancer

1) à CtBP (C-terminal binding protein), un co-répresseur transcriptionnel (Zhang et al., 2007). Ainsi, l'activation de la glycolyse diminuerait l'expression de SIRT1.

Les sirtuines mitochondriales SIRT3-5 (Haigis et al., 2006; Michishita et al., 2005; Onyango et al., 2002), participent à la régulation de la production d'ATP, le métabolisme cellulaire, l'apoptose et la signalisation cellulaire. Contrairement à la protéine SIRT1 de 100 kDa, les sirtuines mitochondriales sont de petite taille, allant de 30 à 40 kDa. Ainsi, leur séquence d'acides aminés se compose essentiellement d'une séquence d'adressage mitochondrial N-terminal et un domaine central. La fonction déacétylase NAD<sup>+</sup>-dépendante de SIRT3 et SIRT5 est bien définie; en revanche, il n'a pas été identifié de substrat acétylé de SIRT4 et il n'a été montré qu'une activité ADP-ribosyltransférase.

De toutes les protéines mitochondriales, les complexes de la phosphorylation oxydative sont parmi les plus fortement acétylés. De nombreux résidus lysine des complexes I-IV et l'ATP synthase sont ainsi modifiés par acétylation (Kim et al., 2006), laissant entendre qu'une sirtuine mitochondriale pourrait déacétyler ces résidus. Dans les mitochondries de foie de souris SIRT3<sup>-/-</sup>, l'acétylation du complexe I est augmentée et associée à une diminution de la consommation d'oxygène mitochondriale liée aux substrats du complexe I (glutamate + malate). Ceci suggère que SIRT3 pourrait être impliquée dans la régulation du fonctionnement mitochondrial *via* la déacétylation du complexe I (Ahn et al., 2008) Plus récemment, il a été montré que SIRT3 interagit non seulement avec le complexe I mais également avec le complexe II (Cimen et al., 2010).

Certains stress cellulaires conduisent les mitochondries à envoyer différents signaux dans le cytosol et le noyau pour alerter la cellule d'une modification de la fonction mitochondriale. En réponse, des modifications post-transcriptionnelles activent des mécanismes de défense à ce stress ou réparent les dommages cellulaires. Par exemple, la biogenèse mitochondriale exige un programme complexe de transcription capable de répondre aux besoins énergétiques de la cellule en coordonnant l'expression des gènes nucléaires et mitochondriaux (Scarpulla, 2002). Contrairement au contrôle transcriptionnel antérograde des mitochondries par des régulateurs de transcription nucléaire comme PGC-1 $\alpha$  (*PPAR gamma coactivateur 1  $\alpha$* ), la voie de signalisation rétrograde de la mitochondrie vers le noyau est mal connue chez les mammifères. Bien qu'il n'y ait pas de preuve reliant directement les sirtuines à une voie de signalisation rétrograde, des changements d'activité des sirtuines mitochondriales pourraient avoir une influence sur les signaux transmis par les mitochondries.

SIRT1 déacétyle et active PGC-1 $\alpha$ , un facteur clé dans la régulation transcriptionnelle des gènes impliqués dans l'oxydation des acides gras et la phosphorylation oxydative (Gerhart-Hines et al., 2007; Rodgers et al., 2005). PGC-1 $\alpha$  est aussi un régulateur transcriptionnel ayant un rôle central dans la biogenèse mitochondriale (Kelly and Scarpulla, 2004) Les modifications post-traductionnelles occupent aussi une place prépondérante dans la régulation de cette activité. Il a été montré que la déacétylation de PGC-1 $\alpha$  augmente son activité activatrice de gènes impliqués dans le fonctionnement mitochondrial du tissu adipeux brun et du muscle squelettique (Lagouge et al., 2006). Les sirtuines mitochondriales et nucléaires ont donc un rôle régulateur du métabolisme cellulaire et pourraient ainsi être des cibles intéressantes dans la stratégie thérapeutique de nombreuses pathologies impliquant des anomalies du métabolisme cellulaire.

De nombreuses études ont mis en évidence que le resvératrol pouvait prévenir ou ralentir la progression d'une large variété de pathologies telles que le cancer (Jang et al., 1997), les maladies cardio-vasculaires (Bradamante et al., 2004), les ischémies cérébrales (Wang et al., 2002) et pouvait également améliorer la résistance au stress et augmenter la durée de vie de nombreux organismes, de la levure aux vertébrés (Howitz et al., 2003; Valenzano et al., 2006). Les mécanismes par lesquels le resvératrol exerce ces effets bénéfiques ne sont pas encore complètement identifiés. Hormis son activité antioxydante intrinsèque (Lopez-Velez et al., 2003; Tadolini et al., 2000), le resvératrol régule l'activité de différentes enzymes, incluant la sirtuine SIRT1 dont il est activateur allostérique. Le resvératrol se présente sous deux formes isomères, *trans*- et *cis*-, avec un passage de la forme *trans*- à la forme *cis*- par irradiation UV. Le *trans*-resvératrol est donc une molécule photosensible qu'une simple exposition à la lumière suffit à transformer de manière irréversible dans son isomère *cis*. L'isomère *trans* est la forme bioactive. Le resvératrol est un composé naturel polyphénolique retrouvé principalement dans la peau du raisin rouge et dans le vin rouge. Il augmente l'activité de SIRT1, augmentant ainsi la déacétylation de certaines protéines cibles de SIRT1 telles que PGC-1 $\alpha$  (Lagouge et al., 2006). L'augmentation de l'activité de PGC-1 $\alpha$  conduit à l'augmentation de l'expression du gène codant pour NRF-1. NRF-1 active TFAM et à son tour augmente la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial (Scarpulla, 2002). Le resvératrol *via* SIRT1 semble ainsi augmenter la biogenèse mitochondriale.

Le resvératrol aurait également un rôle protecteur dans le développement des maladies neurodégénératives. Une étude réalisée dans une lignée cellulaire de neuroblastome a montré

qu'il pourrait empêcher les effets toxiques de l'alpha-synucléine dans la maladie de Parkinson (Albani et al., 2009). Dans un modèle murin de la maladie d'Alzheimer, l'administration de resvératrol entraînerait une diminution de la formation de la plaque  $\beta$ -amyloïde (Karuppagounder et al., 2009). Le resvératrol pourrait également permettre la réduction de la neurodégénérescence dans l'hippocampe et empêcher la réduction des capacités d'apprentissage (Kim et al., 2007; Vingtdoux et al., 2008). Cependant, malgré ces effets bénéfiques, les résultats concernant le resvératrol sont contradictoires et il a été montré qu'il avait également, selon les concentrations utilisées, des effets pro-oxydants. Cet effet pro-oxydant est susceptible d'être tenu responsable des effets cytotoxiques, anti-prolifératifs et même pro-apoptiques de ce composé (Ahmad et al., 2003; de la Lastra and Villegas, 2007).



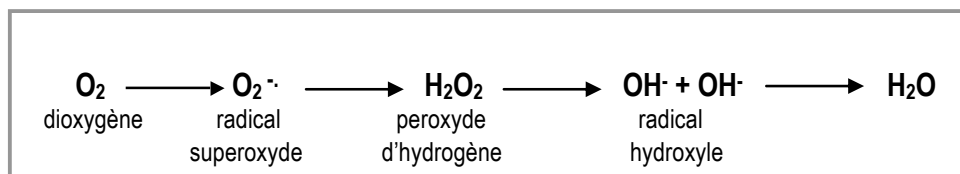
### ***1.2.4. Le stress oxydatif***

Les mitochondries sont une source de production élevée de radicaux libres ou « Reactive Oxygen Species » (ROS) (Boveris and Chance, 1973). Cette production est conséquente puisqu'on évalue que 1 à 4 % de l'oxygène consommé en condition basale est affecté à la production de radical superoxyde (Chance et al., 1979). Le principal radical produit est l'anion superoxyde, mais le radical qui diffuse hors de la mitochondrie est le peroxyde d'hydrogène (Figure 6). La transformation de l'anion superoxyde en peroxyde d'hydrogène est réalisée par une superoxyde dismutase mitochondriale à manganèse (MnSOD). Les complexes I et III de la chaîne respiratoire sont les deux sites principaux de production de radicaux libres mitochondriaux. La production de radicaux libres varie en fonction des substrats et de l'activité métabolique des mitochondries puisque la majorité des auteurs rapportent que la diminution du potentiel de membrane mitochondrial s'accompagne d'une diminution de la production radicalaire. En cas de ralentissement de la chaîne respiratoire ou de blocage de celle-ci, les électrons non utilisés peuvent réagir avec des molécules d'oxygène et former des ROS. La roténone, inhibiteur du complexe I, majore la production de radicaux libres (Li et al., 2003). Physiologiquement, les protéines appartenant à la famille des UCP (pour uncoupling protein) pourraient jouer un rôle dans la régulation de la production mitochondriale de radicaux libres en diminuant ce potentiel de membrane mitochondrial (Negre-Salvayre et al., 1997)

Les ROS sont des composés radicalaires, c'est-à-dire une espèce chimique très instable possédant un électron célibataire non apparié. Leur toxicité vient de leur grande réactivité vis-à-vis des protéines, des lipides et de l'ADN. La surproduction de radicaux libres a un rôle néfaste sur les complexes de la chaîne respiratoire en induisant une oxydation protéique responsable d'une diminution de leur activité (Fridovich, 1997). Le complexe I est à la fois la source et la cible de ces radicaux libres. L'oxydation du complexe I diminue son activité et provoque ainsi une surproduction de ROS. De plus, l'augmentation de la production de radicaux libres serait responsable de l'apparition de mutations de l'ADN (génomique ou mitochondrial) et d'une altération de l'expression des protéines mitochondriales (Ott et al., 2007; Piantadosi and Suliman, 2006). Enfin, une autre conséquence d'une augmentation des radicaux libres est la peroxydation des lipides pouvant affecter les fonctions mitochondriales par altération de la membrane interne qui ne joue plus son rôle de barrière (Chen et al., 1995).

Bien que cette production radicalaire ne soit pas spécifiquement liée à une pathologie particulière, son caractère continue et ubiquitaire pourrait être à l'origine d'un stress oxydatif responsable de micro-dommages dont l'accumulation favoriserait le processus du vieillissement (Beckman and Ames, 1998), mais aussi serait impliquée dans différentes pathologies neurodégénératives.

Pour lutter contre l'excès de production de ROS, l'organisme dispose d'un arsenal important d'enzymes antioxydantes ubiquitaires : les superoxydes dismutases (SOD), la glutathion peroxydase (GPx) et la catalase. En effet, l'organisme doit éliminer l'O<sub>2</sub> inutilisé en le faisant réagir avec deux protons; la réaction est catalysée par la SOD et aboutit à la formation de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Le peroxyde d'hydrogène lui aussi toxique est enfin converti en eau par une catalase ou la glutathion peroxydase (Figure 6). Il existe également des molécules antioxydantes hydrosolubles (glutathion, vitamine C, acide urique) et liposolubles (vitamine E, caroténoïdes, bilirubine), intervenant tout particulièrement au niveau des membranes cellulaires et des lipoprotéines plasmatiques. Ainsi, les antioxydants ont été définis comme des substances capables de concurrencer d'autres substrats oxydables à des concentrations relativement basses et donc de retarder ou d'empêcher l'oxydation de ces substrats.

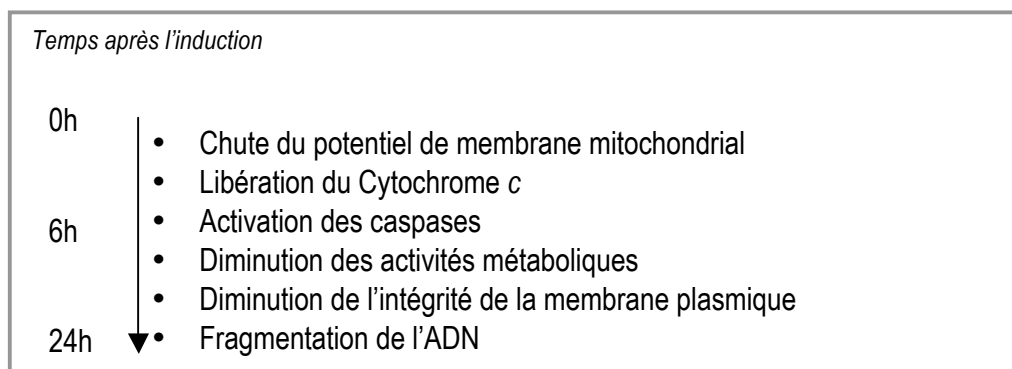


**Figure 6: Intermédiaires réduits de l'oxygène :** équation de réduction monoélectronique de l'oxygène.

### ***1.2.5. Rôle de la mitochondrie dans l'apoptose***

L'apoptose est un mode de mort cellulaire programmée, jouant un rôle essentiel au cours du développement et du fonctionnement du système immunitaire, de l'homéostasie cellulaire et de la morphogénèse tissulaire. L'apoptose facilite l'élimination des cellules endommagées, infectées ou surnuméraires. L'apoptose se déroule d'une manière ordonnée et contrôlée par des protéines codées par des gènes spécifiques, et traduit la réponse des cellules à divers stimuli exogènes ou endogènes. L'apoptose est importante pour maintenir le nombre de cellules à l'équilibre chez l'adulte et le dérèglement de ce processus contribue au

développement de maladies neurodégénératives et à la prolifération tumorale (Fadeel and Orrenius, 2005). La Figure 7 représente de façon schématique les modifications biochimiques successives d'une cellule en apoptose en fonction du temps. La perturbation du fonctionnement de la mitochondrie est un des événements clés de l'apoptose. Les mitochondries subissent plusieurs modifications: relargage du cytochrome *c* dans le cytoplasme, diminution du potentiel de membrane ( $\Delta\Psi_m$ ) avec augmentation de la perméabilité membranaire ce qui conduit à l'activation de l'apoptose.



**Figure 7: Séquence des modifications biochimiques et structurales d'une cellule en apoptose.**

Au niveau moléculaire, l'apoptose est régulée par deux familles de protéines: la famille Bcl-2 (B-cell lymphoma 2) qui est impliquée dans la phase d'initiation de l'apoptose, et la famille des caspases, les protéases responsables de la phase d'exécution (Adams and Cory, 2007; Taylor et al., 2008). Le cytochrome *c* mitochondrial joue un rôle important dans la propagation de plusieurs signaux pro-apoptotiques, en agissant comme un co-facteur pour un complexe d'activation des caspases dans le cytoplasme, appelé apoptosome. La libération du cytochrome *c* de l'espace intermembranaire mitochondrial (EIM) vers le cytosol représente un point de contrôle important dans l'apoptose.

La famille Bcl-2 est divisée en trois groupes :

- les membres du groupe I, tels que Bcl-2 et Bcl-x sont caractérisés généralement par quatre courts domaines conservés BH1-BH2-BH3-BH4 (BH: «Bcl-2 Homology»). Ils présentent des activités anti-apoptotiques.
- les membres du groupe II, tels que Bax, Bad, Bak ont des activités proapoptotiques et une structure très proche des membres du groupe I, mais ils ne possèdent pas le domaine BH4 N-terminal.
- les membres du groupe III, tels que Bid ont tous une activité proapoptotique, mais ils ne possèdent que le domaine BH3.

L'activation des membres pro-apoptotiques de cette famille au cours de la mort cellulaire conduit à la formation de pores dans la membrane externe mitochondriale, permettant la libération du cytochrome *c* et d'autres facteurs pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire mitochondrial dans le cytosol affectant également l'intégrité mitochondriale (Youle and Strasser, 2008). Suite à cette libération, le cytochrome *c* se lie à Apaf-1 ce qui permet le recrutement de la caspase-9 dans un complexe appelé apoptosome (Hill et al., 2004; Logue and Martin, 2008). L'activation allostérique de la caspase-9 dans l'apoptosome conduit alors à l'activation de la cascade des caspases (Slee et al., 1999).

Bcl-2 et ses partenaires interviennent soit en contrôlant l'ouverture des pores et donc la libération des facteurs mitochondriaux, soit en séquestrant Apaf-1 à la membrane mitochondriale empêchant ainsi l'activation des caspases. Ainsi la protéine Bcl-2 inhibe l'apoptose en retenant le pré-complexe Apaf-1/Caspase à la membrane mitochondriale.

Une autre hypothèse permettant d'expliquer le relargage du cytochrome *c* implique l'ouverture du pore de perméabilité de transition (PTP) qui est responsable d'un gonflement de la matrice mitochondriale puis d'une rupture de la membrane externe libérant ainsi le cytochrome *c* (Petronilli et al., 2001). Bax, Bcl-2 ou Bcl-xL sont capables d'interagir avec les protéines qui composent le PTP. De plus, Bax interagit avec VDAC (Narita et al., 1998; Shimizu et al., 1999). Bax (ou Bak) favorise la chute du  $\Delta\Psi_m$  et la sortie du cytochrome *c*, alors que Bcl-2 ou Bcl-xL assure le maintien des fonctions du PTP et empêche le relargage du cytochrome *c*, favorisant ainsi la survie cellulaire (Antonsson et al., 2000).

Au cours de l'apoptose, il existe également une voie indépendante des caspases impliquant l'apoptosis-inducing factor (AIF). L'AIF est séquestré au niveau de l'espace intermembranaire mitochondrial, puis sous l'influence d'un stimulus apoptotique, est relargué dans le cytosol. Il est ensuite acheminé vers le noyau où il est capable d'induire différentes modifications morphologiques caractéristiques de l'apoptose (condensation cytoplasmique et nucléaire, fragmentation nucléaire) sans qu'il y ait eu activation de caspases (Susin et al., 1999). Cependant, les deux voies, celle dépendante de l'activation des caspases et celle de l'AIF, peuvent coexister dans certains modèles cellulaires.

Au cours de l'apoptose, il se produit une fragmentation/fission du réseau mitochondrial nécessitant les effecteurs de la machinerie de fission et de fusion mitochondriale. Il a été montré que la surexpression d'une forme dominante négative de Drp1 avait un effet protecteur contre la libération du cytochrome *c* et l'apoptose (Breckenridge et al., 2003; Frank et al., 2001; Germain et al., 2005; Neuspiel et al., 2005). Ces résultats

suggèrent que l'inhibition de la fission médiée par Drp1 empêche la progression de l'apoptose. En revanche, d'autres études ont démontré que l'absence de Drp1 empêchait partiellement la libération du cytochrome *c*, mais que la mort cellulaire n'était pas affectée (Estaquier and Arnoult, 2007; Parone et al., 2006). Dans ce cas, bien que la libération du cytochrome *c* soit retardée, la libération d'autres protéines de l'EIM, tels que Smac / Diablo, n'est pas affectée, démontrant que la perméabilisation de la membrane externe s'est déroulée normalement.

Le rôle de la fragmentation des mitochondries dans la progression de l'apoptose a également été étudié par la surexpression de MFN2, protéine importante de la fusion mitochondriale. La surexpression de MFN2 diminuerait la libération du cytochrome *c* et de l'apoptose (Jahani-Asl et al., 2007; Sugioka et al., 2004), alors que d'autres auteurs n'ont pas mis en évidence de modification du relargage de cytochrome *c* ni de l'apoptose après surexpression de MFN2, MFN1 ou OPA1 (Sheridan et al., 2008). Les auteurs de cette dernière étude démontrent que des cellules présentant un réseau mitochondrial fusionné libèrent le cytochrome *c* en réponse à des stimuli pro-apoptotiques. La formation de pores par la voie dépendant de Bax/Bak peut donc se produire dans les mitochondries fusionnées. En outre, des cellules avec des niveaux réduits de MFN2 n'ont pas d'augmentation de la libération du cytochrome *c*, suggérant que l'inhibition de la fusion mitochondriale n'est pas une condition préalable à la perméabilisation de la membrane externe (Arnoult et al., 2005b). Par ailleurs, de nombreuses études ont mis en évidence un réseau mitochondrial fragmenté dans des cellules non apoptotiques, ce qui indique que la fission mitochondriale ne suffit pas à entraîner une apoptose (Delivani et al., 2006; Karbowski et al., 2006; Norris and Youle, 2008; Sheridan et al., 2008; Szabadkai et al., 2004; Taguchi et al., 2007). La fission mitochondriale n'est pas nécessaire à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et à l'apoptose, mais agit comme un facteur contribuant à la libération de facteurs mitochondriaux. L'altération de la libération du cytochrome *c* qui est observée dans les cellules où la fission mitochondriale induite par Drp1 est inhibée pourrait être due à des perturbations de l'architecture des crêtes mitochondriales. Un remodelage des crêtes semble nécessaire à une libération rapide et complète du cytochrome *c* au cours de l'apoptose (Arnoult et al., 2005a; Scorrano et al., 2002). Ce remodelage des crêtes impliquerait la protéine mitochondriale OPA1 (*optic atrophy 1*), protéine de la machinerie de fusion mitochondriale qui régule également la morphologie des crêtes. OPA1 contrôle le remodelage des crêtes au cours de l'apoptose indépendamment de sa fonction dans la fusion mitochondriale (Frezza et al., 2006). Ceci suggère que pour le processus de libération du cytochrome *c*, les changements de la

morphologie des crêtes sont plus importants que les changements dans l'équilibre fission-fusion mitochondrial (Arnoult, 2007).

Enfin, les mitochondries peuvent être sélectivement éliminées lors de la mort cellulaire programmée, même en l'absence d'activation de caspases (Xue et al., 2001). Cette élimination sélective des mitochondries, couramment nommée mitophagie, est un processus d'élimination des mitochondries qui intervient au cours de l'apoptose, et est augmentée dans les cellules où la fission induite par Drp1 est accrue, alors qu'au contraire, elle est empêchée dans les cellules où la fission induite par Drp1 est inhibée (Arnoult et al., 2005b; Barsoum et al., 2006). Ceci suggère que la fission/fragmentation est une étape nécessaire à la mitophagie. Il a récemment été montré que les protéines MFN1 et MFN2 étaient ubiquitinées lors de la mitophagie par une voie dépendante de PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) et Parkine (*E3 ubiquitin ligase*) permettant ainsi de diminuer le processus de fusion et de faciliter la fragmentation (Gegg et al., 2010). Comme la mitophagie débute après la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale induite par Bax/Bak, la mort cellulaire autophagique pourrait être également une conséquence de cette perméabilisation (Arnoult, 2007). Les cellules dans lesquelles la mitophagie est augmentée sont plus sensibles à la mort cellulaire indépendante des caspases alors qu'au contraire, une diminution de la mitophagie rend les cellules plus résistantes à ce processus autophagique. Ainsi, en réponse à la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale induite par Bax/Bak, deux voies de mort cellulaire semblent être engagées.

## **I.3. Dynamique mitochondriale**

Dans la plupart des cellules, les mitochondries forment un réseau tubulaire connecté. La morphologie du réseau mitochondrial dépend de l'équilibre entre le mécanisme de fusion et le mécanisme de fission mitochondriale. Lorsqu'il existe une altération du processus de fusion, le réseau mitochondrial apparaît fragmenté alors que si le processus de fission est altéré, le réseau devient tubulaire et filamenteux. Plusieurs protéines jouant un rôle clé dans ces événements ont été identifiées. Nous nous intéresserons uniquement aux protéines responsables de pathologies caractérisées.

### ***I.3.1 Les protéines de la fusion : mitofusines et OPA1***

#### **I.3.1.1. Les Mitofusines (MFN1 et MFN2)**

Les mitofusines 1 et 2 (MFN1 et 2) sont de grandes protéines à domaine GTPases de 750 acides aminés, de la famille des dynamines, ancrées dans la membrane externe des mitochondries. Elles interviennent dans la morphologie et la dynamique du réseau mitochondrial en étant impliquées dans le mécanisme de fusion mitochondriale (Chen et al., 2003; Rojo et al., 2002). Elles comportent un domaine GTPase terminal et deux segments Heptad Repeats (HR1 et 2) encadrant la région nécessaire à l'adressage mitochondrial (Figure 8). Dans ce mécanisme, les mitochondries adjacentes s'attacheraient entre elles par leur domaine HR2 en formant une structure « coiled-coil ». Les mitofusines sont donc directement impliquées dans le mécanisme de fusion mitochondriale et leur domaine HR2 est la structure permettant l'amarrage des mitochondries voisines.

La maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A2 est liée à des mutations du gène de la mitofusine 2 localisé en 1q36.2. Les mutations de MFN2 sont responsables d'environ 30% des formes axonales de CMT (Zuchner et al., 2004). Plus de 60 mutations ont été rapportées dont la majorité sont des mutations faux-sens. La plupart de ces mutations affecte le domaine GTPase et les domaines coiled-coil de la protéine. Les mécanismes par lesquels ces mutations conduisent à une dégénérescence axonale ne sont pas connus mais il semblerait que le transport axonal mitochondrial soit altéré (Baloh et al., 2007). Il a été mis en évidence des agrégats de mitochondries dans les parties distales des neurones de patients porteurs de mutations dans *MFN2* (Funalot et al., 2009; Vallat et al., 2008) mais également dans des

modèles de souris *MFN2* porteuses de la mutation p.R94Q (Cartoni et al., 2010). *MFN2* serait nécessaire au transport axonal des mitochondries en interagissant avec les protéines du complexe Miro/Milton (Misko et al., 2010), ce qui expliquerait les anomalies de transport mitochondrial mis en évidence dans des neurones sensitifs de rats en culture porteurs de mutations du gène *MFN2* (Baloh et al., 2007) et les anomalies de distribution axonale des mitochondries dans des neurones moteurs provenant de souris surexprimant des formes mutantes du gène *MFN2* (Detmer et al., 2008). Une autre fonction attribuée à *MFN2* est l'interaction avec le réticulum endoplasmique (de Brito and Scorrano, 2008). Il a été montré que des cellules HeLa et des fibroblastes embryonnaires de souris exprimant une forme mutante de la protéine *MFN2* présentent une altération de la morphologie du réticulum endoplasmique conduisant à un défaut d'interaction avec la mitochondrie et à une anomalie de capture du calcium par la mitochondrie.

La protéine *MFN2* joue un rôle dans la régulation du métabolisme énergétique mitochondrial. L'inhibition de l'expression de *MFN2* dans la lignée de myoblastes L6E9 diminue l'oxydation du glucose et le potentiel de membrane mitochondrial (Bach et al., 2003). De plus, l'expression de *MFN2* dans le muscle squelettique est réduite chez des patients atteints d'obésité ou de diabète de type 2 (Bach et al., 2005) alors qu'elle est augmentée après exercice physique (Cartoni et al., 2005). Une autre étude réalisée à partir de cellules HeLa et de myoblastes L6E9 a montré qu'une diminution de 50% de l'expression de *MFN2* conduit à une diminution de l'oxydation du glucose, du pyruvate, du palmitate et du potentiel de membrane mitochondrial. Cette baisse d'expression est également associée à une réduction de l'expression de certaines sous unités des complexe I, II, III et V de la chaîne respiratoire mitochondriale alors qu'une surexpression conduit à une augmentation du potentiel de membrane, de l'oxydation du glucose et de l'expression de sous unités des complexes I, IV et V (Pich et al., 2005). Différentes études réalisées sur des fibroblastes de patients porteurs de mutations dans le gène *MFN2* ont montré qu'il existait une atteinte du métabolisme énergétique mitochondrial caractérisé par un découplage des OXPHOS avec un maintien de la synthèse d'ATP par une augmentation de la respiration liée au complexe II (Guillet et al., 2010; Loiseau et al., 2007). Ce découplage est associé à une chute du potentiel de membrane de 30%. En revanche, il n'a pas été mis en évidence d'altération du réseau mitochondrial et il n'a pas été retrouvé de production en excès de radicaux libres ni de sensibilité accrue à l'apoptose.



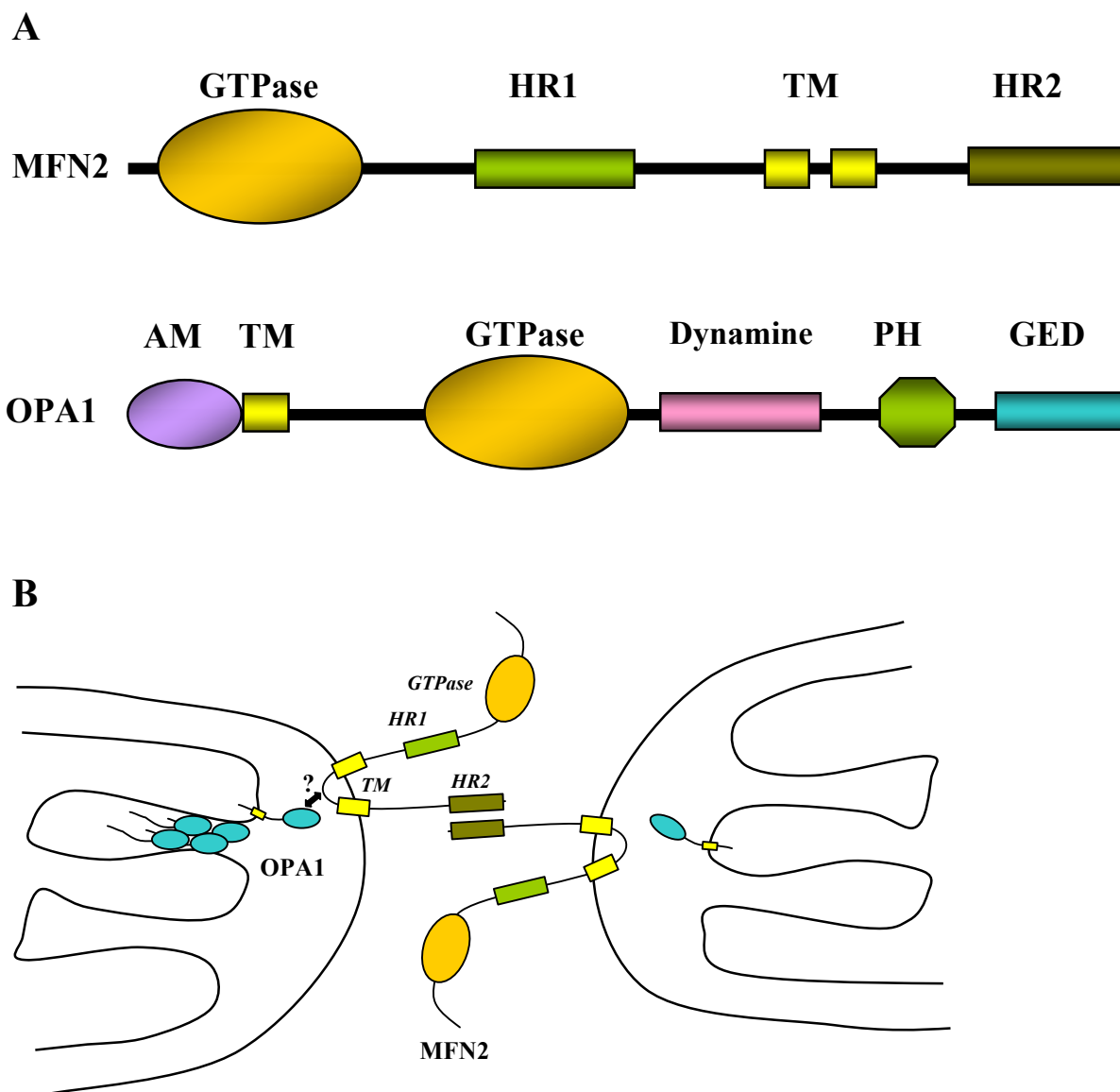
### I.3.1.2. Optic Atrophy 1 (OPA1)

OPA1 est une protéine de 960 acides aminés codée par le gène *OPA1* localisé sur le chromosome 3 (Eiberg et al., 1994) et identifié en 2000 (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000). OPA1 est exprimée dans tous les tissus et surexprimée dans la rétine (Delettre et al., 2001). Il existe 8 isoformes de cette protéine obtenues par épissage alternatif. OPA1 est une dynamine/GTPase possédant un domaine central de type dynamine très conservé, un domaine GTPasique et une séquence d'adressage à la mitochondrie en N-terminal. Cette protéine est localisée au niveau de la membrane interne des mitochondries et serait surtout présente au niveau des crêtes mitochondriales (Olichon et al., 2002).

OPA1 est impliquée dans la fusion mitochondriale. En effet, l'inhibition d'OPA1 par l'utilisation de siRNA (small interfering RNA) dans des cellules HeLa est responsable d'une fragmentation du réseau mitochondrial (Olichon et al., 2003). OPA1 nécessiterait un clivage pour être activée et induire une courbure des membranes et permettre la fusion (Bossy-Wetzel et al., 2003). La fonction de fusion d'OPA1 dépend de la présence de MFN1 mais est indépendante de MFN2 (Cipolat et al., 2004).

Les mutations du gène *OPA1* sont responsables de l'atrophie optique autosomique dominante (ADOA) due à une dégénérescence bilatérale du nerf optique. A ce jour, plus de 200 mutations pathogènes ont été rapportées (Ferre et al., 2009). Ces mutations touchent principalement les domaines GTPase et dynamine et sont majoritairement tronquantes (40%). Aucune corrélation génotype-phénotype n'a pu être établie (Cohn et al., 2007; Pesch et al., 2001; Puomila et al., 2005). Cependant, il existe une corrélation associant ADOA et surdité à la mutation p.R445H. Récemment, des travaux réalisés sur des fibroblastes de patients atteints d'ADOA ont montré une fragmentation du réseau mitochondrial associée à certaines mutations dont la mutation p.R445H (Amati-Bonneau et al., 2005) et des anomalies énergétiques dans des fibroblastes de patients ADOA (Chevrollier et al., 2008). L'activité du complexe IV est diminuée de 25% et associée à un découplage (diminution du rapport ATP/O) indiquant une baisse d'efficacité des phosphorylations oxydatives (Chevrollier et al., 2008). Une diminution de l'activité du complexe I lors de la culture de fibroblastes de patients ADOA en milieu galactose a aussi été montrée (Zanna et al., 2008). Le rôle d'OPA1 dans la maintenance de l'ADNmt a également été suggéré dans plusieurs études récentes par la mise en évidence de délétions multiples dans le muscle de patients atteints d'ADOA (Amati-Bonneau et al., 2008) mais aussi dans des levures exprimant des mutations du gène *Msp1p*

(homologue d'OPA1 chez la levure) (Diot et al., 2009). De plus, OPA1 a un rôle anti-apoptotique. L'inhibition de l'expression d'OPA1 par siRNA sur des cellules HeLa conduit à une libération du cytochrome *c* par déstructuration des crêtes mitochondriales, ce qui conduit à une apoptose caspase-dépendante (Olichon et al., 2003). Il a également été mis en évidence une sensibilité accrue à l'apoptose induite par la staurosporine dans des fibroblastes de patients porteurs de mutations dans *OPA1* (Olichon et al., 2007).



**Figure 8: Les protéines impliquées dans le processus de fusion mitochondriale.**

**A. Représentation des domaines fonctionnels des protéines mitofusine 2 (MFN2) et OPA1.**

Les mitofusines possèdent un domaine GTPase caractéristique de la famille des dynamines, deux structures « coiled-coil » constituées de motifs hydrophobes heptad repeat 1 et 2 (HR1, HR2) et un double domaine transmembranaire (TM).

OPA1 possède une séquence d'adressage mitochondriale (AM), un domaine transmembranaire (TM), un domaine GTPase, un domaine dynamine, un domaine d'homologie aux pleckstrines (PH) et un domaine effecteur GTPase (GED).

**B. La fusion mitochondriale.** Les mitofusines localisées à la membrane externe de deux mitochondries adjacentes vont interagir au niveau de leur domaine HR2 pour favoriser le rapprochement des mitochondries et permettre leur fusion en présence de la protéine OPA1, localisée à la membrane interne qui intervient également dans ce processus.

## ***I.3.2. Les protéines de la fission : Drp1 et GDAP1***

### **I.3.2.1. La dynamin-related protein 1 (Drp1)**

La croissance suivie de la division d'une mitochondrie conduit à l'apparition de nouvelles mitochondries. Cette division débute par l'apparition d'un sillon de division sur la membrane interne et nécessite une protéine dynamin-like conservée au cours de l'évolution et appelée Drp1 (dynamin-related protein1) (Yoon et al., 2003) ou DLP1. Cette protéine est codée par le gène nucléaire *DNML1* (dynamin like1) localisé en 12p11.21. Elle présente certaines homologues de structure avec les protéines de la famille des dynamines (famille de GTPases) puisqu'elle possède un domaine GTPase dynamin-like en C-terminal, un domaine central dynamin-like et un domaine GTPase effecteur (GED) qui régule l'hydrolyse du GTP (Figure 9). En revanche, Drp1 a un domaine riche en proline (PRD) différent de celui des dynamines et ne possède pas de domaine d'homologie à la pleckstrine (PH) impliqué dans l'adressage des protéines à la membrane.

Drp1 est une protéine cytoplasmique recrutée au niveau des sites de scission de la membrane externe par Fis1, une protéine de la membrane externe mitochondriale (Youle and Karbowski, 2005). A ce niveau, Drp1 agirait comme une mécanoenzyme participant à la constriction du tubule mitochondrial. Il a été montré que l'inhibition d'expression de cette protéine ou que la surexpression du mutant p.K38A sont responsables d'une augmentation de la fusion mitochondriale (Lee et al., 2004; Smirnova et al., 2001).

Il a été rapporté une mutation dans *Drp1* responsable d'un phénotype sévère associant une microcéphalie, une atrophie optique et un développement cérébral anormal avec décès prématuré (Waterham et al., 2007).

### **I.3.2.2. Ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 (GDAP1)**

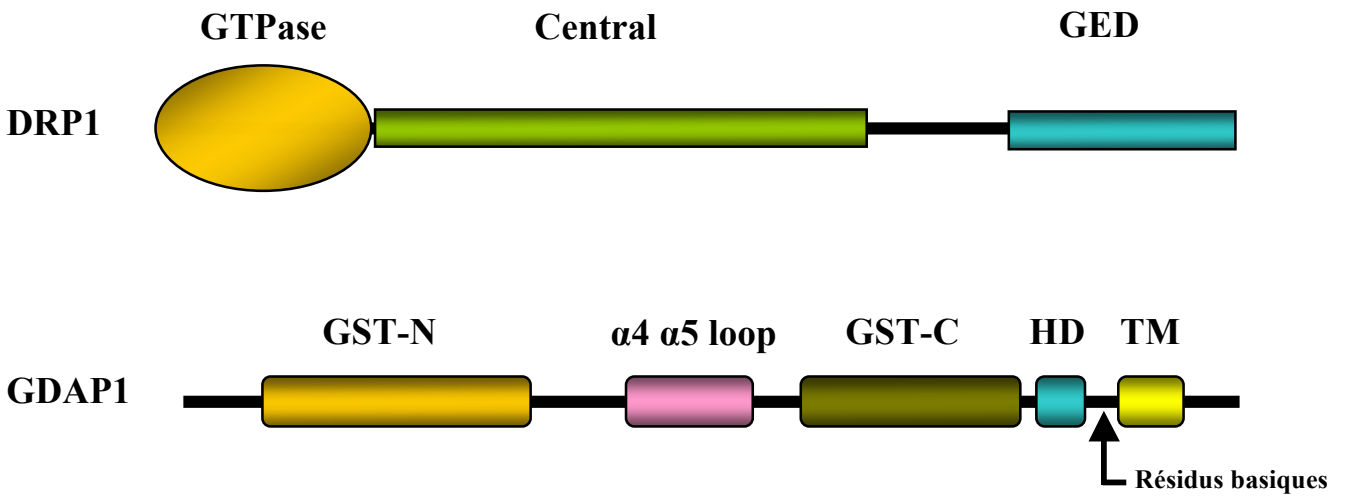
La protéine GDAP1 est une protéine de 358 acides aminés codée par le gène *GDAP1* (8q21.11). Son nom vient du fait qu'elle a été trouvée surexprimée dans une lignée cellulaire de neuroblastome de souris (Neuro2a) dans des conditions de différenciation cholinergique induite par les gangliosides (Liu et al., 1999). Il s'agit d'une protéine de la membrane externe mitochondriale (Niemann et al., 2005) avec une extrémité COOH terminale contenant un domaine transmembranaire (TMD) permettant son ancrage à la membrane externe. Les études phylogénétiques et les analyses structurelles suggèrent que GDAP1 appartient à une sous-famille des glutathion-S-transférases (GST) (Cuesta et al., 2002; Marco et al., 2004; Shield et

al., 2006). Les enzymes GST sont connus pour jouer un rôle clé dans la détoxification et la réduction des espèces réactives de l'oxygène (ROS). Ces domaines ont été prédits à l'aide d'outils bioinformatiques (Cuesta et al., 2002; Marco et al., 2004) et aucune activité GST n'a été démontrée à ce jour (Pedrola et al., 2005; Shield et al., 2006). GDAP1 a deux domaines GST typiques : le domaine I (GST-N) situé dans la région N-terminale et le domaine II (GST-C) dans la région C-terminale. Elle possède également un domaine hydrophobe (HD1) localisé au cytoplasme. Une séquence riche en acides aminés basiques est située entre ces deux domaines et interviendrait dans la localisation mitochondriale et dans la fonction de fission mitochondriale de la protéine (Wagner et al., 2009). En outre, GDAP1 contient deux régions supplémentaires entre les acides aminés 152-164 et 169-195 constituant la boucle  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5.

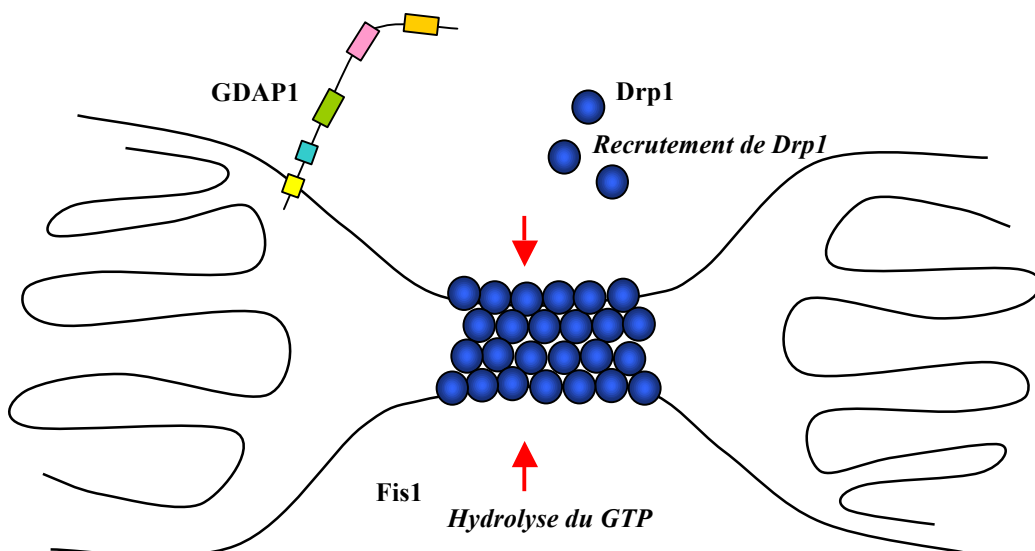
Le gène *GDAP1* est impliqué aussi bien dans les formes AR et AD axonales de CMT (AR-CMT2 et CMT2K) (Claramunt et al., 2005; Cuesta et al., 2002), que dans la forme AR démyélinisante (CMT4A) (Baxter et al., 2002).

Les aspects génétiques, moléculaires, cliniques et physiopathologiques concernant cette protéine sont développés dans la partie II.2 traitant spécifiquement du CMT4A/2K associés aux mutations de la protéine GDAP1.

A



B



**Figure 9: Les protéines impliquées dans le processus de fission mitochondriale**

**A. Représentation schématique des protéines Drp1 et Gdap1.**

Drp1 possède des domaines caractéristiques de la famille des dynamines GTPases avec un domaine GTPase, un domaine central et un domaine GTPase effecteur (GED).

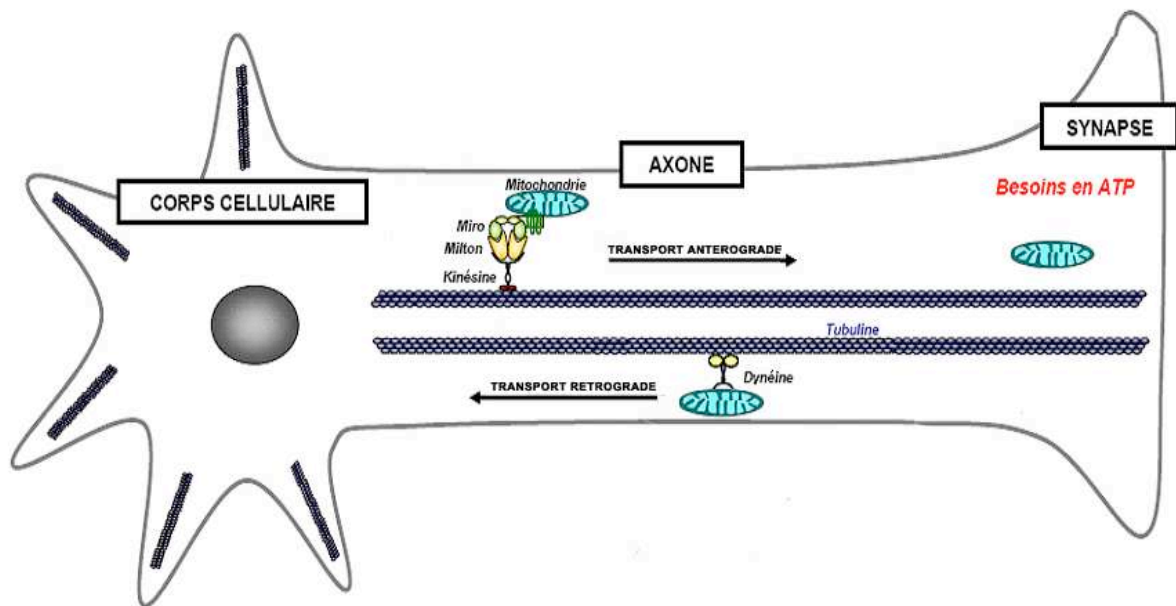
Gdap1 possède deux domaines caractéristiques des protéines GST (GST-N et GST-C), un domaine hydrophobe (HD1) et un domaine transmembranaire (TMD) encadrant une séquence basique importante pour la localisation et la fonction de la protéine.

**B. La fission mitochondriale.** Drp1 localisé dans le cytosol est recruté à la membrane mitochondriale par interaction et fixation à Fis1, puis s'oligomérisent au niveau des sites de fission. L'action moléculaire de Drp1 nécessite une hydrolyse du GTP ce qui permet une constriction d'un anneau de protéines Drp1 (flèches rouges), puis un étirement d'une spirale de protéines Drp1 pour effectuer la fission. Le rôle de Gdap1 est encore mal connu.

### ***I.3.3. Transport mitochondrial***

Les phénomènes de fusion et de fission sont dépendants du déplacement des mitochondries le long du cytosquelette et répartissent le réseau mitochondrial ce qui assure la distribution d'ATP aux sites cellulaires à forte demande énergétique. Au niveau neuronal, on distingue un transport mitochondrial antérograde s'effectuant du corps cellulaire vers les jonctions synaptiques, et le transport rétrograde s'effectuant dans le sens inverse. Le transport antérograde interviendrait dans l'apport des mitochondries à leur site d'action tandis que le transport rétrograde permettrait la dégradation des organites au niveau du corps cellulaire (Miller and Sheetz, 2004). Ce transport mitochondrial fait intervenir les protéines du cytosquelette. Les kinésines, dont les principales sont KIF1B (Nangaku et al., 1994) et KIF5B (Tanaka et al., 1998), sont impliquées dans le transport antérograde et les dynéines interviendraient dans le transport rétrograde. Ces deux familles de protéines hydrolysent l'ATP afin de permettre leur déplacement le long des microtubules. Les mitochondries seraient attachées à ces protéines par l'intermédiaire de protéines adaptatrices : Milton et Miro (Glater et al., 2006).

Il a été rapporté une famille japonaise présentant un CMT2A lié à une mutation p.Q98L du gène *KIF1B* au niveau de son site de liaison à l'ATP (Saito et al., 1997; Zhao et al., 2001). Le caractère pathogène de la mutation a été confirmé sur un modèle de souris transgéniques exprimant cette mutation à l'état hétérozygote avec un phénotype associant une faiblesse motrice progressive (Zhao et al., 2001). Il a été mis en évidence une anomalie du transport des vésicules synaptiques dans ce modèle.



**Figure 10 : Organisation du transport axonal mitochondrial.**

Les mitochondries sont transportées le long des microtubules dans le sens antérograde par les kinésines et dans le sens rétrograde par les dynéines. Leur interaction avec ces deux types de protéines motrices se fait par l'intermédiaire de protéines adaptatrices telles que Milton et Miro.



# II. La maladie de Charcot-Marie-Tooth

## II.1 Aspects cliniques et classification

La maladie de Charcot-Marie-Tooth est une neuropathie périphérique héréditaire sensitivo-motrice. Sa prévalence est estimée de 10 à 30 pour 100 000 en fonction des zones géographiques (Emery, 1991). Elle a été décrite en 1886 par Charcot et Marie comme "une forme particulière d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains" (Charcot and Marie, 1886). Elle se caractérise par un déficit moteur et une amyotrophie touchant les extrémités des membres, une réduction ou une abolition des réflexes ostéo-tendineux et des troubles sensitifs distaux affectant les différentes modalités sensitives. A ces signes neurologiques s'associent souvent des déformations orthopédiques telles que des pieds creux ou plats et une scoliose. L'évolution de cette maladie est chronique, ascendante et lentement progressive. Toutefois, il existe une grande variabilité interindividuelle et intrafamiliale (Bouhouche et al., 2007).

La classification des CMT prend en compte le mode de transmission de la maladie, les résultats de l'examen électroneuromyographique (ENMG) et la génétique moléculaire. Le mode de transmission peut être autosomique dominant, dominant lié à l'X ou autosomique récessif. Les formes dominantes (CMTAD) sont les plus fréquentes en Europe, tandis que les formes récessives (CMTAR) sont retrouvées au Maghreb et au Moyen-Orient où les unions consanguines sont fréquentes. L'ENMG permet de distinguer les formes axonales et les formes démyélinisantes. Les formes démyélinisantes sont définies par des vitesses de conduction motrice (VCM) du nerf médian inférieures à 35 m/s, les formes axonales par des vitesses de conduction supérieures à 40 m/s et les formes intermédiaires par des VCM comprises entre ces deux valeurs (Bouche et al., 1983). La classification a un grand intérêt pour guider le diagnostic moléculaire des différentes formes de CMT.

### ***II.1.1. Les formes autosomiques dominantes***

Les formes les plus fréquentes sont les formes autosomiques dominantes, soit démyélinisantes (CMT1), soit axonales (CMT2) et les formes liées à l’X (CMTX) (Table I).

#### **II.1.1.1. Formes démyélinisantes**

Dans la majorité des formes démyélinisantes, 60 à 70 % selon les études, la maladie est liée à la région 17p11.2, c’est le CMT1A. Le CMT1A est associé de façon quasi constante à une duplication de cette région, qui contient le gène codant pour une protéine de la myéline périphérique, PMP22 (Table I) (Raeymaekers et al., 1991). Une étude réalisée sur 119 patients avec CMT1A a permis de définir le phénotype clinique et électrophysiologique associé à cette mutation (Birouk et al., 1997). L’âge de début des symptômes est très variable, allant de la petite enfance à la 8<sup>ème</sup> décennie. Cependant, 70% des patients développent les premiers signes avant l’âge de 20 ans. L’âge de début est variable entre les individus d’une même famille. L’examen électroneuromyographique met en évidence une polyneuropathie démyélinisante sensitivo-motrice, caractérisée par un ralentissement diffus et homogène de la conduction nerveuse sur l’ensemble des troncs nerveux et le long d’un même nerf. Les VCM sont précocement diminuées, dès l’âge de 2 ans, et restent inchangées au cours de la vie d’un individu. L’atteinte myélinique s’accompagne secondairement, et de façon constante, d’une atteinte axonale, qui conditionne l’installation et la progression du déficit moteur.

Un second locus, le CMT1B, a été localisé sur le chromosome 1. Ce sont des mutations du gène *P0* (Table I) qui code pour une protéine structurale de la myéline périphérique, qui sont alors responsables du phénotype (Kulkens et al., 1993). Les données électrophysiologiques ont permis de distinguer une forme démyélinisante et une forme axonale liées aux mutations du gène *P0*. La forme démyélinisante, le CMT1B, a un phénotype proche du CMT1A et une surdité peut être présente (CMT1E). La forme axonale, le CMT2I/J, a un début tardif avec des VCM soit normales, soit intermédiaires (De Jonghe et al., 1999). Ces différents phénotypes sont déterminés par le type et la position de la mutation.

Les autres gènes impliqués dans ces formes autosomiques dominantes démyélinisantes sont *LITAF* (impliqué dans la dégradation des protéines) pour le CMT1C, *EGR2* (facteur de transcription) pour le CMT1D et *NEFL* (protéines des neurofilaments) pour le CMT1F.

### **II.1.1.2. Formes axonales**

Les formes axonales (CMT2) correspondent à des lésions prépondérantes au niveau de l'axone. Leur fréquence est beaucoup moins importante que celle des CMT démyélinisants dont elles représentent environ le tiers. On compte une dizaine de variétés de CMT2 dont le CMT2K impliquant la protéine GDAP1.

La forme la plus fréquente est le CMT2A2 lié à des mutations du gène codant pour la protéine MFN2 (cf paragraphe I.3.1.1). Le phénotype associé à ce CMT2A2 est hétérogène avec une pénétrance variable et un début qui peut être précoce ou tardif selon les mutations. Certains signes cliniques associés ont été décrits tels qu'une atrophie optique, une migraine, ou une atteinte du système nerveux central. Une forme avec encéphalopathie fatale a été récemment rapportée (Boaretto et al., 2010).

Certains types de CMT2 sont cliniquement caractéristiques : par exemple, le CMT2B est caractérisé par l'association à la neuropathie de troubles trophiques (maux perforants, ulcérations). Le CMT2C est caractérisé par une atteinte des cordes vocales. Le CMT2D, allélique au locus des neuropathies motrices distales héréditaires de type V, se manifeste par une atteinte inaugurale et prédominante des membres supérieurs. Le CMT2J est associé à une surdité, une anomalie de la motilité pupillaire et des troubles sensitifs marqués. Cliniquement, la plupart des CMT2 reste difficilement distinguable des formes démyélinisantes de CMT. L'électrophysiologie tient un rôle important afin de distinguer les formes axonales des formes démyélinisantes. En effet, dans les CMT2 les VCM sont habituellement normales et les amplitudes des potentiels moteurs et sensitifs sont sévèrement diminuées.

## ***II.1.2. Les formes autosomiques récessives***

Les formes autosomiques récessives sont plus rares et plus sévères et peuvent être de nature axonale (AR-CMT2) ou démyélinisante (CMT4).

### **II.1.2.1. Formes démyélinisantes**

9 gènes ont été identifiés parmi les 10 localisés (Table I) dont le gène *GDAP1* (Baxter et al., 2002) pour le CMT4A en 8q13.3-q21.1. Généralement ces formes de CMT ont un âge de début souvent très précoce, une atteinte distale inaugurale à laquelle s'ajoute secondairement une atteinte des muscles proximaux, en particulier des membres inférieurs,

fréquemment responsable d'une perte de la marche, et la présence de signes associés (Dubourg et al., 2006). Ces signes associés sont importants à rechercher et peuvent orienter le diagnostic moléculaire : atteinte des cordes vocales parfois observée avec les mutations du gène *GDAP1*, atteinte faciale et bulbaire évocatrices d'une mutation du gène *MTMR2*, scoliose précoce et sévère en cas de mutation du gène *KIAA1985* et surdité de perception orientant vers une mutation de *NDRG1*. L'âge de début de la maladie est très variable entre les différentes formes de CMT : dans la petite enfance pour les CMT4A et 4F, dans les deux premières décennies pour le CMT4B, entre 5 et 15 ans pour le CMT4C, avant 10 ans pour le CMT4D et dès la naissance pour le CMT4E (forme congénitale sévère qui peut être responsable d'une hypotonie généralisée). L'évolution reste extrêmement variable entre ces différents types de CMT et y compris au sein d'une même famille : certaines personnes présentent peu ou pas de symptômes alors que d'autres ont un handicap fonctionnel important. Dans le cas du CMT4C, la maladie peut progresser lentement, la marche restant possible après 40 ans. Le CMT4D, plus sévère, évolue progressivement vers une incapacité importante autour de la cinquantaine. Sur le plan électrophysiologique, les VCM sont généralement très diminuées (< 25 m/s) excepté dans le cas du CMT4A et du CMT4G (Dubourg et al., 2006). En raison d'une perte axonale secondaire souvent importante, il est fréquent que l'ENMG soit peu informatif avec des nerfs distaux non stimulables. Dans les cas où aucun nerf ne peut être stimulé, la biopsie nerveuse est souvent le seul moyen de déterminer s'il s'agit d'un processus axonal ou démyélinisant.

### **II.1.2.2. Formes axonales**

Dans les formes axonales, 3 gènes ont été localisés dont 2 identifiés : le premier locus a été localisé en 1q21.2 (Bouhouché et al., 1999) et une mutation sur le gène de la LMNA a été identifiée (De Sandre-Giovannoli et al., 2002). Le second locus a été localisé sur le chromosome 19 en 19q13 avec une forme mineure de la maladie (Leal et al., 2001) mais le gène responsable n'a toujours pas été identifié à ce jour. Le dernier locus a été localisé en 8q21.3 avec mise en évidence d'une mutation sur le gène *GDAP1* (CMT2K) (Cuesta et al., 2002).

**Table I : Classification des maladies de Charcot-Marie-Tooth en fonction du mode de transmission de la maladie et des critères électrophysiologiques. Les formes liées à GDAP1 sont en caractères gras**

Type	Gène impliqué	Locus
<b>Dominant</b>		
<b>Démyélinisant</b>		
CMT1A	<i>PMP22</i>	17p11
CMT1B	<i>MPZ</i>	1q22
CMT1C	<i>LITAF</i>	16p13
CMT1D	<i>EGR2</i>	10q21
CMT1E	<i>MPZ</i>	1q22
CMT1F	<i>NEFL</i>	8p21
<b>Axonal</b>		
CMT2A1	<i>KIF1B</i>	1p36
CMT2A2	<i>MFN2</i>	1p36
CMT2B	<i>RAB7</i>	3q13
CMT2C	<i>TRPV4</i>	12q23
CMT2D	<i>GARS</i>	7p15
CMT2E	<i>NEFL</i>	8p21
CMT2F	<i>HSPB1</i>	7q11
CMT2G	<i>non connu</i>	12q12
CMT2I/J	<i>MPZ</i>	1q22
<b>CMT2K</b>	<b><i>GDAP1</i></b>	<b>8q21</b>
CMT2L	<i>HSPB8</i>	12q24
CMT2M	<i>DNM2</i>	19p12
CMT2N	<i>AARS</i>	16q22
<b>Intermédiaire</b>		
DI-CMTA	<i>non connu</i>	10q24
DI-CMTB	<i>DNM2</i>	19p12
DI-CMTC	<i>YARS</i>	1p34
DI-CMTD	<i>MPZ</i>	1q22
<b>Récessif</b>		
<b>Démyélinisant</b>		
<b>CMT4A</b>	<b><i>GDAP1</i></b>	<b>8q21</b>
CMT4B1	<i>MTMR2</i>	11q23
CMT4B2	<i>SBF2</i>	11p15
CMT4C	<i>KIAA 1985/SH3TC2</i>	5q32
CMT4D	<i>NDRG1</i>	8q24
CMT4E	<i>EGR2</i>	10q21
CMT4F	<i>PRX</i>	19q13
CMT4G	<i>HK1</i>	10q23
CMT4H	<i>FGD4</i>	12q12
CMT4J	<i>FIG4</i>	6q21
<b>Axonal</b>		
AR-CMT2A	<i>LMNA</i>	1q21
AR-CMT2B	<i>MED25</i>	19q13
<b>AR-CMT2C</b>	<b><i>GDAP1</i></b>	<b>8q21</b>
Sans dénomination	<i>LRSAMI</i>	9q33
<b>Lié à l'X</b>		
CMTX1	<i>GJB1</i>	Xq13
CMTX2	<i>non connu</i>	Xp22
CMTX3	<i>non connu</i>	Xq26
CMTX4	<i>non connu</i>	Xq24
CMTX5	<i>PRPS1</i>	Xq22

## **II.2. La maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 4A/2K**

### ***II.2.1 Aspects génétiques et moléculaires***

Le gène *GDAP1*, d'une longueur de 23 728 paires de bases (pb), contient 6 exons et 5 introns. Le facteur de transcription Yin Yang 1 (YY1) participerait à la régulation de l'expression de *GDAP1* (Ratajewski and Pulaski, 2009). Deux variants de transcription de *GDAP1* ont été identifiés. Le variant de transcription 1 code pour la plus longue isoforme, appelée isoforme a (358 acides aminés). Le variant de transcription 2, code pour l'isoforme b, et utilise un site d'épissage alternatif dans la région 5'. L'isoforme b (290 acides aminés) contient une partie N-terminale plus courte que l'isoforme a. Les études réalisées sur l'ARNm par RT-PCR ont montré que *GDAP1* était une protéine ubiquitaire avec une expression prédominante dans le tissu nerveux (Cuesta et al., 2002). *GDAP1* serait exprimée principalement dans les axones plutôt que dans les cellules de Schwann (Pedrola et al., 2008) mais d'autres travaux ont observé que *GDAP1* est exprimée aussi bien dans les neurones moteurs et sensitifs du système nerveux périphérique, que dans les cellules de Schwann (Niemann et al., 2005), ce qui suggère que le CMT pourrait primitivement affecter les cellules de Schwann ou les neurones, ou les deux de façon concomitante.

### ***II.2.2. Aspects cliniques***

Initialement, Ben Othmane et al. (1993) avaient identifié le locus du CMT4A en 8q13-21 dans une famille tunisienne (Ben Othmane et al., 1993). Le gène correspondant, *GDAP1*, a ensuite été identifié par Baxter et al. (2002) chez des patients issus de 4 familles tunisiennes présentant des neuropathies périphériques sévères, démyélinisantes, avec une transmission récessive, liées à trois mutations différentes dans le gène *GDAP1* : 2 mutations non-sens (p.W31X et p.S194X) et une mutation faux-sens (p.R161H) (Baxter et al., 2002). A ce jour, plus de 40 mutations dans *GDAP1* ont été décrites. Le gène *GDAP1* a ainsi été impliqué aussi bien dans les formes AR et AD axonales (AR-CMT2 et CMT2K) (Azzedine et al., 2003; Birouk et al., 2003; Claramunt et al., 2005; Cuesta et al., 2002; Stojkovic et al., 2004), que dans la forme AR démyélinisante (CMT4A) (Baxter et al., 2002; Ben Othmane et al., 1993) et que dans la forme intermédiaire (Nelis et al., 2002; Senderek et al., 2003).

Le CMT impliquant des mutations GDAP1 conduit généralement à un phénotype sévère apparaissant dans l'enfance ou la petite enfance. Dans la plupart des cas, la progression de la maladie conduit à une incapacité fonctionnelle avant la fin de la deuxième décennie de la vie (Bernard et al., 2006). Cette forme de CMT causée par des mutations GDAP1 est généralement transmise sur le mode autosomique récessif. Ces formes récessives sont sévères avec l'apparition précoce au cours de la première décennie. La progression rapide de la maladie conduit à une incapacité fonctionnelle avec recours quasi constant à une aide technique pour la déambulation. L'association à une paralysie des cordes vocales est fréquente dans le CMT4A et survient en général au cours de la deuxième ou de la troisième décennie (Sevilla et al., 2008). Toutefois, les présentations phénotypiques des patients porteurs de mutations de GDAP1 sont hétérogènes. En ce qui concerne l'âge de début et l'évolution de la maladie, il existe non seulement une grande variabilité clinique entre les patients porteurs d'une même mutation, mais aussi une variabilité importante intrafamiliale (Azzedine et al., 2003; Moroni et al., 2009; Sahin-Calapoglu et al., 2009). La forme autosomique dominante, le CMT2K, est rare et n'a été rapportée que dans quelques cas (Chung et al., 2008; Claramunt et al., 2005; Crimella et al., 2010). Ces formes dominantes sont généralement moins sévères que les formes récessives, avec un début plus tardif (après la deuxième décennie) et une évolution plus lente de la maladie.

Il semble nécessaire qu'un plus grand nombre de patients atteints de CMT impliquant des mutations de GDAP1 soient rapportés, avec des données cliniques et électrophysiologiques détaillées, afin d'établir une corrélation plus précise entre le génotype et le phénotype des différentes formes de la maladie.

### ***II.2.3. Aspects physiopathologiques***

Le rôle de la protéine GDAP1 est encore mal connu mais il semblerait qu'elle soit impliquée dans la dynamique mitochondriale. Contrairement à d'autres protéines à domaines GTPases de la famille des dynamines tels que MFN2, OPA1 et Drp1, la séquence de GDAP1 ne suggère aucune implication dans la dynamique mitochondriale. Cependant, plusieurs études ont suggéré que GDAP1 joue un rôle dans la fission mitochondriale. Ainsi, la surexpression de GDAP1 induit une fragmentation du réseau mitochondrial contrebalancée par l'expression d'un mutant dominant négatif de Drp1 ou des protéines de fusion mitofusines 1 et 2 (Niemann et al., 2005). L'inhibition sélective de GDAP1 par siRNA entraîne un aspect

tubulaire du réseau mitochondrial (Niemann et al., 2005). Il a été montré que le TMD joue un rôle clé dans le ciblage mitochondrial et l'insertion membranaire (Wagner et al., 2009). Les acides aminés chargés positivement à proximité du TMD participent à la fois au ciblage mitochondrial et à la fonction de fission de GDAP1. Le domaine hydrophobe (HD) semble indispensable pour la fission mitochondriale impliquant la protéine GDAP1. L'altération des processus de fission et de fusion mitochondriales affecte de manière significative la fonction neuronale. Les neurones sont particulièrement vulnérables à un dysfonctionnement mitochondrial (Benard et al., 2007). En effet, les neurones sont des cellules hautement spécialisées qui exigent de grandes quantités d'énergie pour maintenir la transmission ionique tout au long des axones et des synapses. Spécifiquement touchés dans le CMT, les neurones moteurs ont des axones pouvant atteindre un mètre de long. La migration mitochondriale le long de l'axone joue un rôle primordial dans le transport de l'énergie et il a été suggéré que le défaut du transport axonal a un rôle important dans la physiopathologie du CMT2A2 impliquant la protéine MFN2 (Cartoni and Martinou, 2009). Ainsi, un mécanisme similaire pourrait être évoqué dans le CMT4A/2K impliquant la protéine GDAP1, avec une altération importante de la dynamique mitochondriale ou du transport axonal touchant les nerfs périphériques, et privant les régions distales de l'axone d'une source d'énergie nécessaire à son bon fonctionnement. Des études complémentaires sont cependant nécessaires pour mieux caractériser le rôle fonctionnel des différents domaines de la protéine et comprendre l'implication de GDAP1 dans la dynamique mitochondriale.

La protéine GDAP1 pourrait également être impliquée dans la lutte contre le stress oxydant. Cette hypothèse est basée sur le fait que GDAP1 a des domaines structurels correspondant à des domaines GST, bien qu'aucune activité GST n'ait été démontrée à ce jour. Cependant, ces études ont utilisé une protéine tronquée ne contenant plus de domaine transmembranaire. En effet, l'activité GST peut nécessiter une localisation précise de la protéine mitochondriale. Les GSTs sont largement distribuées et jouent un rôle dans la détoxification des xénobiotiques et des substances toxiques endogènes. Une altération du fonctionnement des GSTs pourrait être responsable d'une production accrue de ROS. Les radicaux libres en excès peuvent avoir des effets délétères sur la peroxydation lipidique, et sur l'oxydation protéique des complexes de la chaîne respiratoire et plus particulièrement du complexe I (Ketterer et al., 1988; Zhao et al., 1999). Il a été récemment montré que les mutations dominantes de GDAP1 étaient associées à une production augmentée de ROS, à une sensibilité accrue à l'apoptose, et à une altération du potentiel membranaire mitochondrial



(Niemann et al., 2009). Ce résultat suggère que la surproduction de ROS pourrait contribuer à la physiopathologie des formes dominantes de CMT impliquant GDAP1.

### III. Problématique de la thèse

Un des axes principaux de recherche du laboratoire est l'étude des mécanismes physiopathologiques qui conduisent aux neuropathies héréditaires associées aux mutations de l'ADNmt et aux gènes de la dynamique mitochondriale. Ce travail de thèse porte particulièrement sur le gène *GDAP1* dont les mutations sont responsables d'une maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 4A ou 2K (CMT4A ou CMT2K). Le rôle de la protéine GDAP1 est encore peu connu. Les premières données fonctionnelles ont montré un rôle dans la fission mitochondriale, c'est-à-dire le mécanisme moléculaire conduisant à la scission d'une mitochondrie. De nombreuses observations montrent une relation entre les modifications de structure du réseau mitochondrial et la fonction énergétique mitochondriale mais les règles régissant ce rapport structure/fonction ne sont pas clairement établies. Nous avons souhaité étudier le métabolisme énergétique et la structure mitochondriale dans le CMT4A/2K.

Nous avons constitué une banque de fibroblastes cutanés prélevés chez des sujets sains et chez des patients atteints de CMT4A ou CMT2K. Ces cellules, qui peuvent être prélevées de manière très peu invasive par biopsie cutanée superficielle, sont fréquemment utilisées pour étudier la fonction énergétique mitochondriale et constituent à l'heure actuelle un modèle admis pour l'étude des pathologies mitochondriales. Les fibroblastes constituent un modèle cellulaire de mutations dominantes ou récessives de *GDAP1*.

Nous avons analysé différents paramètres fonctionnels mitochondriaux tels que la mesure de la consommation d'oxygène et l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, l'étude de la morphologie mitochondriale par microscopie à fluorescence, l'étude de l'expression de gènes impliqués dans la bioénergétique mitochondriale et des marqueurs de stress oxydatif. Nous avons mis en évidence des anomalies bioénergétiques et structurales mitochondriales dans cette pathologie ce qui confirme l'implication de la mitochondrie et renforce l'hypothèse de l'altération du transport axonal des mitochondries dans la physiopathologie de la maladie.

Nos données ont permis d'ajouter des critères métaboliques à la pathogénicité des mutations de *GDAP1*. Afin d'améliorer le diagnostic moléculaire et clinique de cette maladie, nous avons créé une base de données internationale spécifique à *GDAP1* afin de collecter toutes les variations de séquence pathogènes ou non, soit publiées soit soumises directement, en y associant des informations cliniques et électrophysiologiques utiles pour l'étude des corrélations génotype-phénotype.

# *RESULTATS ET DISCUSSION*

# I. Articles n°1 et 2

## Article 1 :

### **Mitochondrial Complex I Deficiency in GDAP1-related Autosomal Dominant Charcot-Marie Tooth Disease (CMT2K).**

Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, Malinge MC, Letournel F, Nicolas G, Richard L, Ferre M, Verny C, Dubas F, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P. Neurogenetics. 2009, 10(2):145–150

## Article 2 :

### **Simultaneous MFN2 and GDAP1 mutations cause major mitochondrial defects in a CMT patient.**

Cassereau J, Casasnovas C, Gueguen N, Malinge MC, Guillet V, Reynier P, Bonneau D, Amati-Bonneau P, Banchs I, Volpini V, Procaccio V, Chevrollier A. Neurology. 2011, 76(17):1524-1526

## I.1 Introduction des articles n°1 et 2

Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'impact des mutations de *GDAP1* sur le métabolisme énergétique mitochondrial. Les mutations dans le gène *GDAP1* sont habituellement décrites comme responsables de CMT de forme récessive démyélinisante (CMT4A) (Baxter et al., 2002) ou de CMT de forme axonale récessive ou dominante (AR-CMT2C et CMT2K) (Azzedine et al., 2003; Chung et al., 2008; Claramunt et al., 2005; Cuesta et al., 2002).

La protéine GDAP1 est une protéine de la membrane externe mitochondriale qui serait impliquée dans le mécanisme de fission mitochondriale (Niemann et al., 2005). Les études structurales et phylogénétiques suggèrent que cette protéine ferait partie de la famille des Glutathion-S-transférases (GST) (Marco et al., 2004), enzymes ubiquitaires participant à la lutte contre le stress oxydant, sans qu'aucune fonction GST n'ait pu être mise en évidence à ce jour (Pedrola et al., 2005; Shield et al., 2006).

Plusieurs études ont montré que des protéines majeures de la dynamique mitochondriale telles que Mitofusine 2 (MFN2), responsable du CMT2A2, et OPA1, responsable de l'Atrophie Optique Dominante, sont aussi impliquées dans la bioénergétique mitochondriale (Chevrollier et al., 2008; Guillet et al., 2010; Loiseau et al., 2007; Pich et al., 2005). En raison de cette intrication entre dynamique et bioénergétique mitochondriale, nous avons émis l'hypothèse qu'un déficit énergétique pourrait intervenir dans la physiopathologie du CMT4A/2K. Nous avons ainsi évalué les paramètres respiratoires des fibroblastes de patients issus d'une même famille atteints de CMT2K par mutation p.C240Y de *GDAP1*. Cette étude fait l'objet du premier article de la thèse.

Grâce à notre collaboration avec le Dr Casanovas du Centre Hospitalier de Barcelone, nous avons eu l'opportunité d'étudier par la suite un patient atteint d'une forme sévère de CMT porteur à la fois d'une mutation homozygote p.Q163X de *GDAP1* et d'une mutation hétérozygote p.R468H dans *MFN2* que nous avons précédemment décrite comme étant pathogène (Casanovas et al., 2010). Le premier objectif de ce travail était de confirmer l'implication de GDAP1 dans le métabolisme énergétique mitochondrial chez un patient AR-CMT2, en comparant les résultats observés à ceux obtenus chez les patients atteints d'une forme dominante de la maladie et chez des patients porteurs de mutations dans *MFN2*. Le second objectif de cette étude était de déterminer s'il existait une corrélation entre la sévérité

clinique et les anomalies bioénergétiques observées. Les résultats de ce travail sont rapportés dans le deuxième article.

## **I.2. Article n°1**

### **Mitochondrial Complex I Deficiency in GDAP1-related Autosomal Dominant Charcot-Marie Tooth Disease (CMT2K).**

Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, Malinge MC, Letournel F, Nicolas G,  
Richard L, Ferre M, Verny C, Dubas F, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Bonneau D,  
Reynier P.

**Neurogenetics.**  
**2009, 10(2):145–150**

## Mitochondrial complex I deficiency in *GDAP1*-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K)

Julien Cassereau · Arnaud Chevrollier ·  
Naïg Gueguen · Marie-Claire Malinge ·  
Franck Letournel · Guillaume Nicolas ·  
Laurence Richard · Marc Ferre · Christophe Verny ·  
Frédéric Dubas · Vincent Procaccio ·  
Patrizia Amati-Bonneau · Dominique Bonneau ·  
Pascal Reynier

Received: 14 October 2008 / Accepted: 25 November 2008 / Published online: 17 December 2008  
© Springer-Verlag 2008

**Abstract** Mutations in *GDAP1*, an outer mitochondrial membrane protein responsible for recessive Charcot-Marie-Tooth disease (CMT4A), have also been associated

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s10048-008-0166-9) contains supplementary material, which is available to authorized users.

Julien Cassereau and Arnaud Chevrollier contributed equally to this work.

J. Cassereau · A. Chevrollier · N. Gueguen · M. Ferre ·  
P. Amati-Bonneau · D. Bonneau · P. Reynier  
INSERM, U694,  
4 rue Larrey,  
Angers 49933, France

A. Chevrollier (✉) · N. Gueguen · M.-C. Malinge · M. Ferre ·  
V. Procaccio · P. Amati-Bonneau · D. Bonneau · P. Reynier  
Département de Biochimie et Génétique,  
Centre Hospitalier Universitaire,  
4 rue Larrey,  
Angers 49933, France  
e-mail: archevrollier@chu-angers.fr

J. Cassereau · G. Nicolas · C. Verny · F. Dubas  
Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire,  
4 rue Larrey,  
Angers 49933, France

F. Letournel  
Département de Pathologie Cellulaire et Tissulaire,  
UF de Neurobiologie et Neuropathologie, CHU,  
4 rue Larrey,  
49933 Angers, France

L. Richard  
Département de Neurologie, Centre Hospitalier Universitaire,  
2 Av. Martin Luther King,  
Limoges 87042, France

with CMT2K, a dominant form of the disease. The three CMT2K patients we studied carried a novel dominant *GDAP1* mutation, C240Y (c.719G>A). Mitochondrial respiratory chain complex I activity in fibroblasts from CMT2K patients was 40% lower than in controls, whereas the tubular mitochondria were 33% larger in diameter and the mitochondrial mass was 20% greater. Thus, besides the regulatory role *GDAP1* plays in mitochondrial network dynamics, it may also be involved in energy production and in the control of mitochondrial volume.

**Keywords** *GDAP1* · Autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease · CMT2K · Mitochondrial dynamics · Complex I

### Introduction

Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) hereditary neuropathy, first described in 1886 [1], belongs to a clinically and genetically heterogeneous group of diseases characterized by chronic motor and sensory polyneuropathy. CMT affects about one in 2,500 people [2], leading to progressive loss of sensation, weakness, muscle atrophy, loss of deep tendon reflexes, and foot deformities. On the basis of electrophysiologic criteria, CMT can be classified in two major categories: type 1, the demyelinating form, characterized by slow motor median nerve conduction velocity (NCV; less than 38 m/s); and type 2, the axonal form, with a normal or slightly reduced NCV. Mutations in the gene coding for the ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 (*GDAP1*) are responsible for CMT4A [3, 4], the most frequent recessive



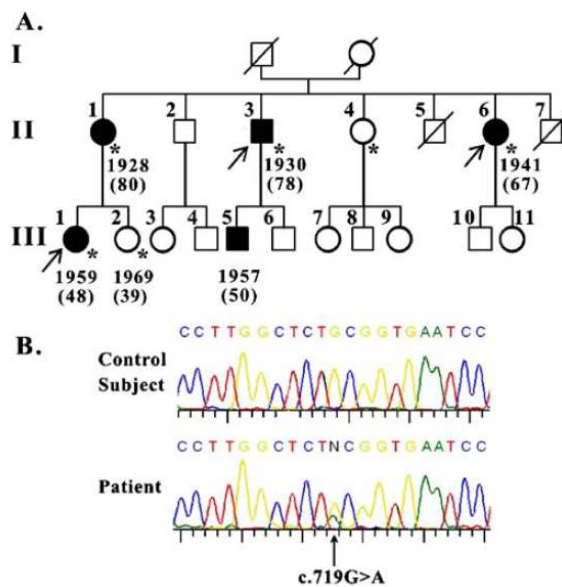
subtype of demyelinating CMT, and have also been associated with CMT2K, a dominant form of CMT [5, 6].

GDAP1, a 358 amino acid protein mainly expressed in motor and primary sensory neurons, is located in the external mitochondrial membrane [7, 8]. Although the *GDAP1* sequence shows similarity with glutathione *S*-transferases (GSTs) [3, 4, 9], no functional GST activity has been demonstrated so far [10]. Overexpression of *GDAP1* induces fragmentation of mitochondria, suggesting that GDAP1 plays a role in the fission mechanism of mitochondrial dynamics [7, 11].

Here, we investigate mitochondrial respiratory complex activity and mitochondrial morphology in skin fibroblasts from three CMT2K patients carrying a novel GDAP1 mutation.

## Materials and methods

**Patients** Neurological examination of the three CMT2K patients seen at our institution, II-3, II-6, and III-1 (Fig. 1a), showed moderate weakness in the proximal muscles of the legs, tactile hypoesthesia with a sock-and-glove distribution, and abolition of lower limb reflexes. Vibration sensitivity and pain appreciation were unaltered, and there



**Fig. 1** Missense mutation c.719G>A in the *GDAP1* gene, leading to p.C240Y. **a** Pedigree of the CMT2K family. *Arrows* show the probands, with the year of birth and life span (in *brackets*). As expected for a dominant trait, about half of the sib-groups are carriers. *Open circles* unaffected females, *open squares* unaffected males, *closed circles* affected females, *closed squares* affected males. *Asterisks* In these individuals, DNA genetic analysis was performed. **b** Electropherograms of mutant and control sequences

were no foot deformities. Electrophysiological studies evidenced a normal motor NCV in the median nerve (>50 m/s). Motor action potentials and distal motor latency were normal, whereas sensory nerve action potentials were not recordable. Needle electromyograms showed signs of chronic denervation in the upper limbs with large polyphasic motor unit potentials and decreased recruitment patterns. A muscle biopsy performed on patient III-1 revealed no histologic anomaly.

**Genetic analysis** Blood samples were taken from patients after obtaining informed consent. Genomic DNA was extracted from blood samples using the High Pure PCR Template Preparation Kit (Roche Diagnosis, Mannheim, Germany). Primer couples (available on request) were used to amplify *GDAP1*, *P0*, *PMP22*, *LITAF*, *EGR2*, *NEFL*, and *MFN2* [12] coding exons, including exon–intron junctions. PCR reactions were carried out under standard protocols. The purified PCR products were sequenced using a Ceq2000 DNA sequencer (CEQ DTCS-Quick Start Kit, Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA). Multiple sequence alignments were performed using CLUSTALW software.

**Primary cultures** Human fibroblasts cells were obtained from skin biopsies taken after getting written consent from the three CMT2K patients (II-3, II-6, and III-1), as well as from one unaffected member of the family (III-2); as described elsewhere [13], unaffected voluntary subjects ( $n=6$ , three men and three women; 29–59 years old) were used as controls. Fibroblasts were maintained in DMEM/10% bovine calf serum at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. All fibroblast cultures were mycoplasma free, as shown by the DAPI/Hoechst in situ coloration and by PCR (Venor<sup>®</sup>Gem, BioValley, Marne-la-Vallée, France). All experiments were carried out on cells with similar passage numbers, ranging from five to 15, so as to avoid artifacts due to senescence, i.e., at passage numbers >30.

**Enzymatic activities** Mitochondrial respiratory chain complex activities were measured on cell homogenates using a Beckman DU 640 spectrophotometer (Beckman coulter, Fullerton, CA, USA) as described elsewhere [13, 14].

**Efficiency of mitochondrial ATP production in permeabilized cells** The rate of mitochondrial ATP synthesis and the ATP/O ratio were determined in cells permeabilized by digitonin exposure as previously described [13]. Cells were resuspended in the respiratory buffer (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM mannitol, 10 mM KCl and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) supplemented with 2 mM iodoacetate and 2 mM EDTA, so as to prevent glycolytic ATP synthesis and ATP hydrolysis by cellular ATPases. The respiratory rates of 3–5 × 10<sup>6</sup> cells were recorded at 37°C in 1.5-ml glass chambers using a two-channel, high-resolution Oxygraph

respirometer (Oroboros, Innsbruck, Austria). ATP synthesis was started by addition of 5 mM malate and 5 mM pyruvate, and the subsequent addition of 1.5 mM ADP. Four aliquots were sampled each minute and quenched with an equal volume of 1% TCA solution and neutralized by adding a 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, pH 7.75 buffer. The ATP synthesized in situ was measured using the Enliten ATP assay (Promega, Madison, WI, USA). Luminescence was measured on a multidetection reader for microplates Xenius XML (SAFAS, Monaco) using a 10-s integration period. Standardization was performed with known quantities of ATP measured under the same conditions.

**Reverse transcription-PCR** Total RNA was extracted from skin fibroblasts using RNeasy mini kit (Qiagen, Hilden, Germany). cDNA was synthesized using 1 µg of total RNA with the Advantage reverse transcription system kit (Clontech, Mountain View, CA, USA) and oligonucleotides-dT following the manufacturer's instructions. PCR was performed using the following thermocycle: 95°C for 10 min, 35 cycles (95°C for 30 s, 59°C for 20 s, and 72°C for 30 s) and a final extension step at 72°C for 3 min. Specific primers for each GDAP1 gene and Beta2-Microglobulin (a housekeeping gene) were designed (available on request). DNA was extracted using the Biorobot EZ1 (Qiagen, Hilden, Germany) work station following the manufacturer's instructions.

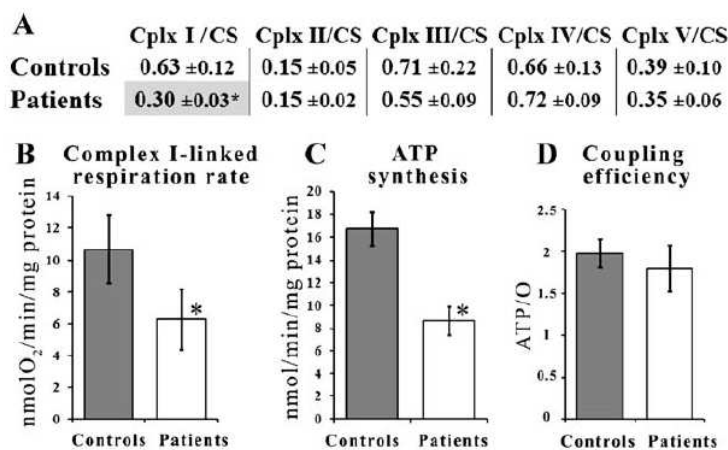
**Western blotting analysis** GDAP1 was detected by Western blotting using mouse polyclonal antibody (Abnova, Taipei,

Taiwan) and mouse monoclonal antibody anti-alpha-Tubulin (Sigma, St Louis, MO, USA).

**Fluorescence imaging** Cells cultured in a two-well chamber slide (Labtek, Nunc International, Naperville, IL, USA) were incubated with 100 nM Mitotracker® to labeled mitochondria network (Molecular Probes, CA, USA) according to manufacturer's instructions. Z-Stack fluorescent images were acquired with a Leica (DMI6000B, Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and a Roper CoolSnap HQ2 camera. MetaMorph software (Molecular Devices, CA, USA) was used to analyze images. Mitochondria length and number were determined using integrated morphometric analysis of regions, created around mitochondria, after deconvolution and thresholding (MetaMorph®, Molecular Devices, CA, USA) [15]. Threshold images were also used to quantify the total mitochondrial area as a fraction of the cell area (See Fig. 2S).

**Electronic microscopy** Mitochondrial ultrastructure was examined as described elsewhere [16]. Fibroblasts were fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer. For epoxy embedding, cells were postfixed in 1% OsO4 in 0.1 M phosphate buffer, dehydrated in an ascending series of ethanol, and embedded in epoxy. Thin sections were examined with a JEOL JME 1011 electron microscope.

**Chemicals** All chemicals were obtained from Sigma Chemicals (St Louis, MO, USA).



**Fig. 2** Mitochondrial complex I activity is lower in CMT2K fibroblasts than in controls. **a** Oxidative phosphorylation enzymatic activities were determined and normalized with respect to the mitochondrial content of whole-cell extracts by correcting each value with reference to the activity of citrate synthase (CS), a reference matrix enzyme. **b** Rate of oxygen consumption with complex I substrates (pyruvate/malate). **c** Mitochondrial ATP production with

complex I substrates. **d** The rate of mitochondrial ATP produced from ADP + Pi per nanomoles of oxygen consumed by permeabilized cells was measured by luminescence assay sampled directly from the polarographic chamber. The efficiency of the OXPHOS (ATP/O) was tested using pyruvate/malate as substrates. Three independent measurements were performed on each sample. The results are expressed as mean values ± SD. Statistical significance: \* $p < 0.05$

**Statistical analysis** Mann–Whitney tests were used for statistical comparisons.

## Results

### C240Y, a new pathogenic mutation in *GDPA1*

The sequencing of *GDPA1* revealed a heterozygous missense mutation, C240Y (c. 719G>A; Fig. 1b). This mutation was found in four affected members (II-1, II-3, II-6, and III-1) and was absent in two unaffected members of the family (II-4 and III-2; Fig. 1a), as well as in the 560 control chromosomes. In all four affected patients, no mutation was found in the *P0*, *PMP22*, *LITAF*, *EGR2*, *NEFL*, and *MFN2* genes [12] known to be involved in dominant CMT. The C240Y mutation is located within the putative GST core region of the *GDPA1* gene [7]. Multiple alignment of the *GDPA1* family, performed with the CLUSTAL program [17], showed that the cysteine in position 240 is highly conserved throughout evolution. The prediction of the impact of this mutation, using Polyphen (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph>) and SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift>) software, suggested that the C240Y substitution would affect the structure and the function of *GDPA1* (Polyphen score, 3.346; SIFT score, 0.004). RT-PCR and Western blotting were performed to confirm the expression of *GDPA1* in patients' fibroblasts as shown in Fig. 1S.

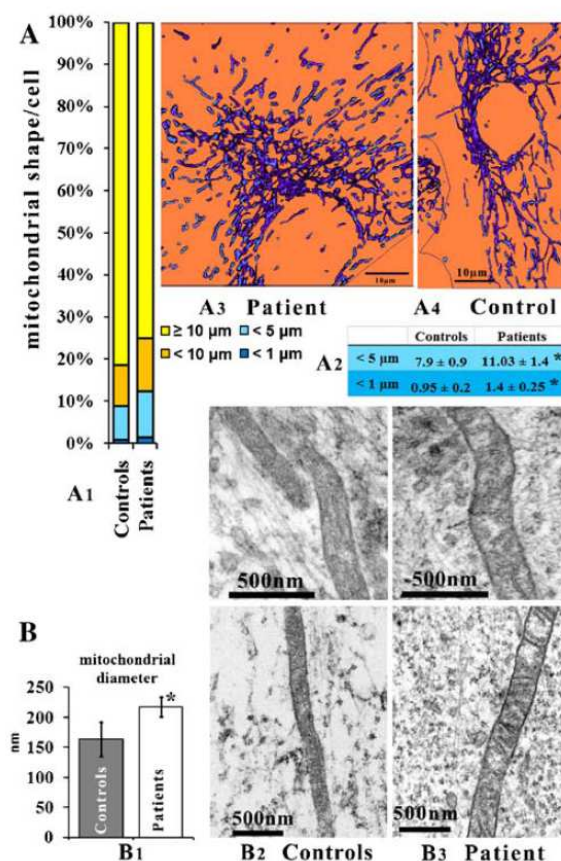
### Mitochondrial complex I deficit in C240Y\_ *GDPA1* cells

Mitochondrial bioenergetics studies showed that the mitochondrial NADH ubiquinone oxidoreductase (complex I) enzymatic activity was 50% lower in fibroblasts from affected patients compared to six control fibroblasts (Fig. 2a). No other oxidative phosphorylation (OXPHOS) complex activity impairment was detected (Fig. 2a). Polarography, using complex I substrates, showed that the respiration rate and the corresponding ATP production were 40% lower in C240Y\_ *GDPA1* fibroblasts compared to normal controls (Fig. 2b and c). Similarly, complex I activity was lower than in controls in a muscle biopsy sample obtained from one of the affected patients (III-1;  $0.055 \pm 0.02$  vs.  $0.19 \pm 0.05$  nmol/min/mg protein). Complex I activity was found to be normal in fibroblasts from an unaffected relative (III-2;  $0.54 \pm 0.15$  nmol/min/mg protein vs.  $0.63 \pm 0.12$ ).

However, no decrease of ATP production was observed in fibroblasts when succinate, a complex II substrate, was used in a polarographic assay (patients,  $18.6 \pm 8$  vs. controls,  $18.3 \pm 4$  nmol/min/mg protein). Moreover, the efficiency of OXPHOS appeared to be unaffected as attested by a normal ATP/O ratio (Fig. 2d).

### Increased mitochondrial mass and partial mitochondrial fragmentation in C240Y\_ *GDPA1* fibroblasts

In fibroblasts from affected patients, the mitochondrial network was partially fragmented and contained a larger number of short mitochondria than control fibroblasts (Fig. 3a). Moreover, quantification of the mitochondrial area using fluorescence imaging indicated a 20% increase of mitochondrial volume in fibroblasts from patients compared to controls ( $11.1 \pm 0.3$  vs.  $9.1 \pm 0.8 \mu\text{m}^2$ ;  $p < 0.05$ ). This result



**Fig. 3** Partial fragmentation of the mitochondrial network and increased diameter of mitochondria in *GDPA1* mutated cells compared to controls. **a** Thresholded fluorescent images were used to quantify mitochondrial length and shape per cell ( $A_1$ ). Each bar graph is the mean of at least 50 controls or mutated cells. Significant differences for the shortest mitochondrial size between patients and controls are shown in  $A_2$ . Representative images of the mitochondrial network are shown in  $A_{3-4}$ . **b** Electron microscopy of patients' fibroblasts shows enlarged tubular mitochondria. The distribution of mitochondrial diameters is shown in histogram  $B_1$ . Representative electron micrographs of mitochondria from patients ( $B_3$ ) and controls ( $B_2$ ) are shown. Values are the means of at least 40 mitochondria in fibroblasts from three patients and in control fibroblasts

is in accordance with the finding of greater matrix citrate synthase enzyme activity in fibroblasts carrying the C240Y amino acid substitution compared to controls ( $393 \pm 67$  vs.  $324 \pm 87$  nmol/min/mg protein;  $p < 0.05$ ).

#### Increased diameter of mitochondria in C240Y\_GDAP1 fibroblasts

Electron microscopy showed that the diameter of the tubular mitochondria was 33% greater in C240Y\_GDAP1 fibroblasts than in controls. The double membrane was present in most of these mitochondria, and inner membrane cristae were visible in the focal plane (Fig. 3b and Fig. 3S).

### Discussion

We report a novel missense heterozygous C240Y (c.719G>A) mutation of the *GDAP1* gene in a French family with autosomal dominant CMT disease. This mutation results in the substitution of a highly conserved cysteine for tyrosine at position 240, located within the GST core region of the GDAP1 protein [7]. The mild neurological phenotype of affected patients from the family investigated is similar to that previously described in two reports of CMT2K caused by a dominant mutation in *GDAP1* [5, 6].

Our analysis of mitochondrial energetic metabolism in skin fibroblasts from three CMT2K patients and from a muscle biopsy performed in one of these patients revealed a functional impairment of mitochondrial complex I activity. In CMT2K fibroblasts, the rate of ATP synthesis driven by complex I was reduced by as much as 50%.

Mitochondrial biogenesis, which was 20% greater in CMT2K fibroblasts than in controls, might moderate the bioenergetic impairment induced by the reduction of complex I activity and attenuate the severity of the phenotype. In addition, the rate of ATP production per unit oxygen consumption (ATP/O ratio) was normal in CMT2K fibroblasts, indicating that the efficiency of oxidative phosphorylation was unaffected. This is not in concordance with the OXPHOS uncoupling that has been shown in complex I deficiencies due to mutations in mitochondria DNA complex I genes [18]. Moreover, a defect in mitochondrial coupling has been also demonstrated in another form of CMT, known as CMT2A, which is a dominant axonal CMT caused by a mutation in the gene coding for mitofusine 2 [13], a mitochondrial protein involved in mitochondrial fusion. This suggests that in CMT2K fibroblasts, the lower respiration rate due to impaired complex I activity reduces ATP production without decreasing the efficiency of oxidative phosphorylation.

It has been shown that GDAP1 also influences the balance between fused and fragmented mitochondria

[7, 11]. CMT2K fibroblasts showed a partial fragmentation of the mitochondrial network, characterized by a mitochondrial reticulum associated with a larger proportion of short mitochondria than in controls. Interestingly, the over-expression of *GDAP1*, carrying dominant missense mutations, also leads to the fragmentation of the mitochondrial network [11], suggesting that the mutation reported here has a negative dominant effect. However, it should be borne in mind that mitochondrial fusion, which is a process dependent on the ATP level [19], may also be affected by the complex I deficiency evidenced in our study.

CMT2K fibroblasts contained significantly enlarged mitochondria. Interestingly, it has been shown in cases of neuritis that the increase of mitochondrial volume is associated with an impairment of the mitochondrial axonal traffic [20], suggesting that a similar phenomenon may be involved in the pathophysiology of CMT2K.

In conclusion, this study provides new insights into the pathophysiology of this dominant axonal neuropathy with the involvement of GDAP1 in the control of mitochondrial volume and oxidative phosphorylation via complex I activity.

**Acknowledgments** We thank C. Wetterwald, S. Geraci and the technicians of the laboratory for technical assistance and Kanaya Malkani for the critical reading and comments on the manuscript. This work was supported by INSERM, the University Hospital of Angers, the University of Angers, France, and by grants from Retina France and the “*Ouvrir les yeux*” patients’ associations (AC, PAB, DB, and PR).

### References

1. Charcot JM, Marie P (1886) Sur une forme particulière d’atrophie musculaire progressive, souvent familiale débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Rev Med* 6:97–138
2. Berger P, Young P, Suter U (2002) Molecular cell biology of Charcot-Marie-Tooth disease. *Neurogenetics* 4:1–15. doi:10.1007/s10048-002-0130-z
3. Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, Stajich JE, Hulette C, Dew-Knight S, Hentati F, Ben Hamida M, Bel S, Stenger JE, Gilbert JR, Pericak-Vance MA, Vance JM (2002) Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 30:21–22. doi:10.1038/ng796
4. Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, Garcia-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, LeGuem E, Marin I, Vilchez JJ, Palau F (2002) The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 30:22–25. doi:10.1038/ng798
5. Claramunt R, Pedrola L, Sevilla T, Lopez de Munain A, Berciano J, Cuesta A, Sanchez-Navarro B, Millan JM, Saifi GM, Lupski JR, Vilchez JJ, Espinos C, Palau F (2005) Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet* 42:358–365. doi:10.1136/jmg.2004.022178
6. Chung KW, Kim SM, Sunwoo IN, Cho SY, Hwang SJ, Kim J, Kang SH, Park KD, Choi KG, Choi IS, Choi BO (2008) A novel GDAP1 Q218E mutation in autosomal dominant Charcot-Marie-

- Tooth disease. *J Hum Genet* 53:360–364. doi:10.1007/s10038-008-0249-3
7. Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 170:1067–1078. doi:10.1083/jcb.200507087
  8. Pedrola L, Espert A, Wu X, Claramunt R, Shy ME, Palau F (2005) GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet* 14:1087–1094. doi:10.1093/hmg/ddi121
  9. Marco A, Cuesta A, Pedrola L, Palau F, Marin I (2004) Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol Biol Evol* 21:176–187. doi:10.1093/molbev/msh013
  10. Shield AJ, Murray TP, Board PG (2006) Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 347:859–866. doi:10.1016/j.bbrc.2006.06.189
  11. Pedrola L, Espert A, Valdes-Sanchez T, Sanchez-Piris M, Sirkowski EE, Scherer SS, Farinas I, Palau F (2008) Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J Cell Mol Med* 12:679–689. doi:10.1111/j.1582-4934.2007.00158.x
  12. Triggs WJ, Brown RH Jr, Menkes DL (2006) Case records of the Massachusetts General Hospital. Case 18-2006. A 57-year-old woman with numbness and weakness of the feet and legs. *N Engl J Med* 354:2584–2592. doi:10.1056/NEJMcpc069009
  13. Loiseau D, Chevrollier A, Vemy C, Guillet V, Gueguen N, Pou De Crescenzo MA, Ferre M, Malinge MC, Guichet A, Nicolas G, Amati-Bonneau P, Malthiery Y, Bonneau D, Reynier P (2007) Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* 61:315–323. doi:10.1002/ana.21086
  14. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35–51. doi:10.1016/0009-8981(94)90055-8
  15. De Mey JR, Kessler P, Dompierre J, Cordelieres FP, Dieterlen A, Vonesch JL, Sibarita JB (2008) Fast 4D microscopy. *Methods Cell Biol* 85:83–112. doi:10.1016/S0091-679X(08)85005-4
  16. Vallat JM, Magy L, Lagrange E, Sturtz F, Magdelaine C, Grid D, Tazir M (2007) Diagnostic value of ultrastructural nerve examination in Charcot-Marie-Tooth disease: two CMT 1B cases with pseudo-recessive inheritance. *Acta Neuropathol* 113:443–449. doi:10.1007/s00401-007-0196-7
  17. Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD (2003) Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31:3497–3500. doi:10.1093/nar/gkg500
  18. Chevrollier A, Guillet V, Loiseau D, Gueguen N, de Crescenzo MA, Vemy C, Eng MF, Dollfus H, Odent S, Milea D, Goizet C, Amati-Bonneau P, Procaccio V, Bonneau D, Reynier P (2008) Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol* 63:794–798. doi:10.1002/ana.21385
  19. Legros F, Lombes A, Frachon P, 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. doi:10.1091/mbc.E02-06-0330
  20. Kaasik A, Safiulina D, Zharkovsky A, Veksler V (2007) Regulation of mitochondrial matrix volume. *Am J Physiol* 292: C157–C163. doi:10.1152/ajpcell.00272.2006

## Supplementary data

Figure 1S :

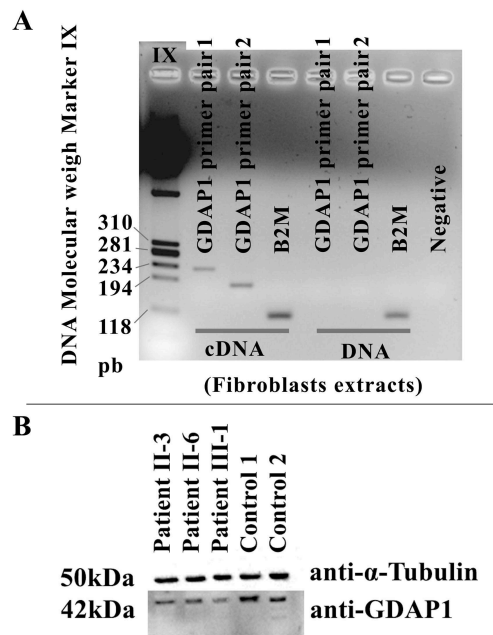


Figure 2S :

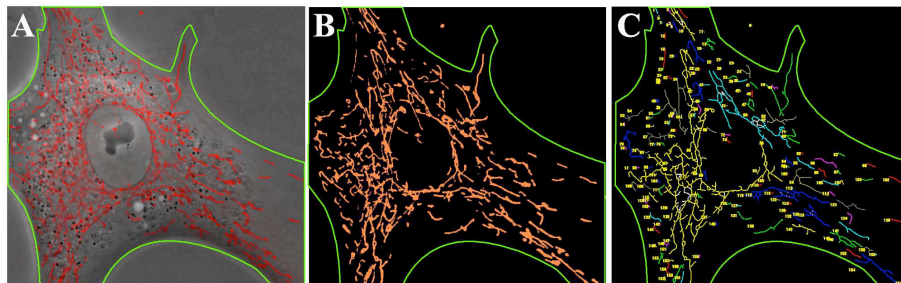
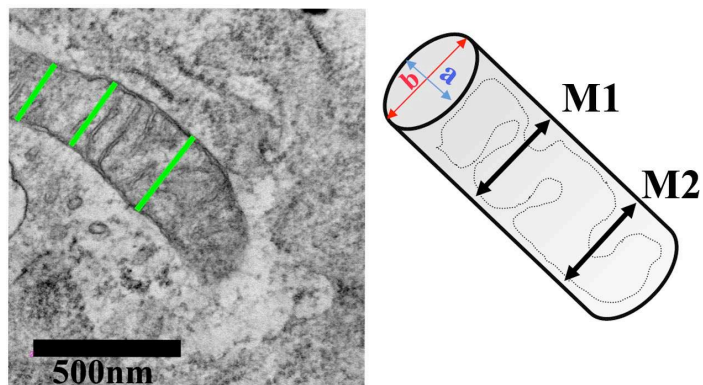


Figure 3S :



## Legends supplementary data

**Figure 1S** GDAP1 is expressed in fibroblasts from patient and controls. **(a)**: The expression of GDAP1 mRNA in human skin fibroblasts as visualized by gel electrophoresis of PCR-amplified products obtained using selective oligonucleotide primers. Bands of the expected size, i.e., 221 and 174 base pairs (bp) were obtained in wells where samples were subjected to reverse transcriptase (RT). The set of primers did not amplify genomic DNA. Beta 2 microglobulin pair of primers (in the exon) was chosen as a control of cDNA and DNA amplification. **b** GDAP1 protein is expressed in skin fibroblasts. Fifteen micrograms of protein lysate from the patients and controls was analyzed by Western blotting. GDAP1 was detected at the predicted size of 42 kDa.  $\alpha$ -Tubulin was used as loading control.

**Figure 2S** Mitochondrial quantification process. Z-stack images were acquired with a Leica (DMI6000B, Microsystems GmbH, Wetzlar, Germany) and a Roper CoolSnap HQ2 camera. We took 21 plane images along the Z-axis at 0.3- $\mu$ m increments. Stack images were deconvolved using a Meinel algorithm. On overlay picture **(a)**, the mitochondria labeled with the Mitotracker® probe are shown in red; the contour cells and the nuclei are shown in phase contrast. MetaMorph software (Molecular Devices, CA, USA) was used to analyze the images. The mitochondrial fluorescent signal was thresholded and the image was binarized **(b)**. Length and number were determined using integrated morphometric analysis of regions created around mitochondria **(c)**. At least 50 controls or mutated cells as in this sequence analysis were used to create the bar graph shown in Fig. 3a. We then compared the subgroups of mitochondrial size between controls and patients using a nonparametric Mann–Whitney test. Phase contrast images were used to determine cell contours (green trace) and the corresponding cell areas. Mitochondrial thresholded signals were used to quantify the total mitochondrial area, which was expressed as a fraction of the corresponding cell area.

**Figure 3S** Calculation of mitochondrial diameter in electronic microscopy. Diameters (a or b) are estimated by the average of several measurements on mitochondrial sections (green lines). M1: Measurement 1; M2: Measurement 2.

### **I.3. Article n°2**

#### **Simultaneous MFN2 and GDAP1 mutations cause major mitochondrial defects in a CMT patient.**

Cassereau J, Casasnovas C, Gueguen N, Malinge MC, Guillet V, Reynier P, Bonneau D, Amati-Bonneau P, Banchs I, Volpini V, Procaccio V, Chevrollier A.

**Neurology**

**2011, 76(17):1524-1526**



## Clinical/Scientific Notes

J. Cassereau, MD  
C. Casasnovas, MD,  
PhD  
N. Gueguen, PhD  
M.-C. Malinge, PharmD  
V. Guillet, PhD  
P. Reynier, MD, PhD  
D. Bonneau, MD, PhD  
P. Amati-Bonneau, MD  
I. Banchs, BS  
V. Volpini, MD, PhD  
V. Procaccio, MD, PhD  
A. Chevrollier, PhD

### **SIMULTANEOUS *MFN2* AND *GDAP1* MUTATIONS CAUSE MAJOR MITOCHONDRIAL DEFECTS IN A PATIENT WITH CMT**

Mutations in the *MFN2* gene are associated with Charcot-Marie-Tooth disease type 2A (CMT2A), a dominant axonal CMT, whereas mutations in *GDAP1* are associated with recessive demyelinating CMT (CMT4A), recessive axonal CMT (AR-CMT2), and dominant axonal CMT (CMT2K). Both proteins are involved in energy metabolism and dynamics of the mitochondrial network.<sup>1-3</sup> We have previously reported that, in fibroblasts from patients with CMT, *MFN2* mutations resulted in a mitochondrial energy coupling defect,<sup>4,5</sup> whereas dominant mutation in *GDAP1* resulted in defective complex I activity.<sup>6</sup>

In this study, we investigated mitochondrial bioenergetics from a severely affected patient with CMT harboring combined mutations in both *GDAP1* and *MFN2* genes.

**Methods.** For details, see e-Methods on the *Neurology*<sup>®</sup> Web site at [www.neurology.org](http://www.neurology.org).

**Patients.** Patient II-5 (figure 1A), a 71-year-old woman of Spanish origin, had severe distal muscle weakness from the age of 3, becoming wheelchair-bound during her third decade. Clinical examination showed severe weakness of limbs with proximal and distal amyotrophy, tactile and nociceptive hypoaesthesia with a gloves-and-socks distribution, and abolition of the limb reflexes. She had pes cavus and moderate vocal cord paresis. Electrophysiologic studies (table e-1) indicated a severe axonal neuropathy characterized by a major reduction of motor action potential in the left median nerve (0.1 mV) with a slightly reduced motor conduction velocity (43 m/s).

Patient II-8, her 56-year-old brother, presented with a mild CMT2 clinical phenotype. Electrophysiologic examination showed a sensory axonal neuropathy (table e-1). His 2 daughters, aged 19 and 25 years, are currently asymptomatic. Patient II-2, who had a phenotype compatible with CMT, had died of respiratory failure.

**Results. Mutation analysis.** Patient II-8 and his asymptomatic daughter (III-15) were found to be heterozygous for the pathogenic p.R468H mutation in *MFN2*, previously described.<sup>7</sup> Individuals II-3, II-4, and II-7

were heterozygous for the p.Q163X mutation in *GDAP1*. Patient II-5 was found to be heterozygous for the p.R468H mutation in *MFN2* and homozygous for the p.Q163X mutation in *GDAP1* (figure 1A).

**Mitochondrial imaging and biochemistry.** No alteration of the mitochondrial network was revealed in *MFN2*:p.R468H fibroblasts and in *MFN2*:p.[R468H]+*GDAP1*:p.[Q163X]+[Q163X] fibroblasts (figure e-1).

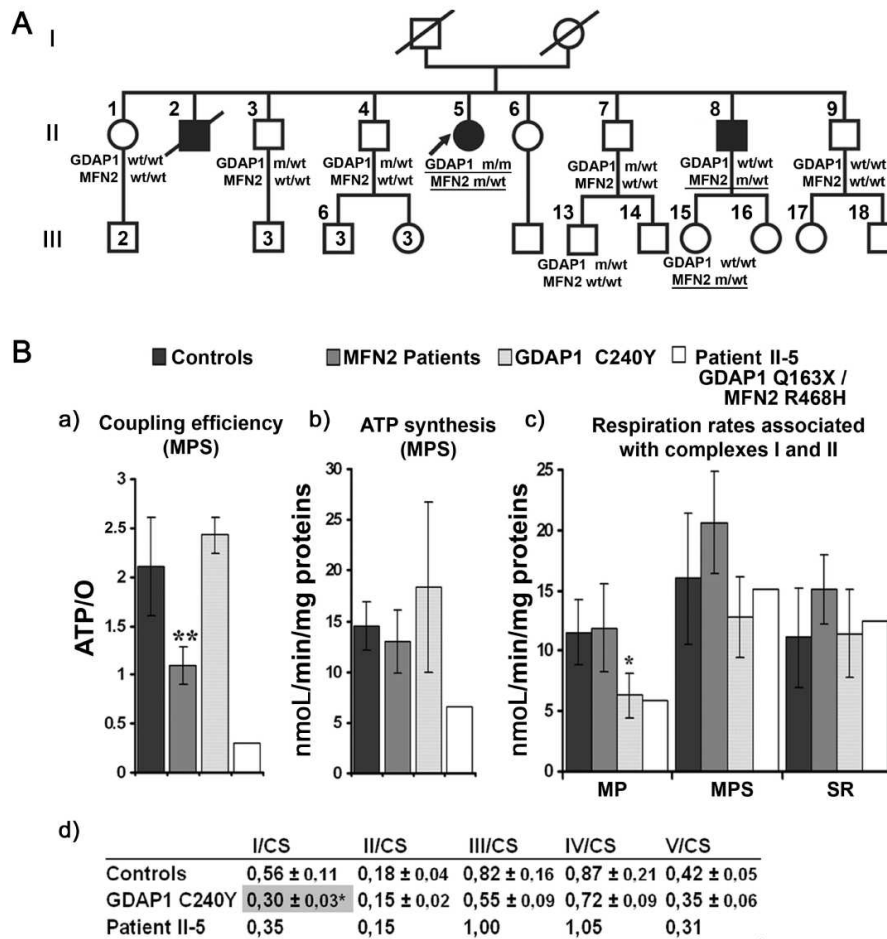
In patient II-5 fibroblasts, a more severe energy coupling defect than in *MFN2* patients was discovered with 85% reduction of the ATP/O ratio compared to controls (figure 1Ba). Mitochondrial uncoupling was associated with a 65% decrease of mitochondrial ATP production that was absent in fibroblasts with a single *MFN2* mutation (figure 1Bb). Similarly to patients with dominant mutation in *GDAP1*, fibroblasts carrying mutations in both *MFN2* and *GDAP1* showed a 40% reduction of complex I activity compared with *MFN2* patients and controls (see malate pyruvate complex I substrates value on figure 1Bc, and enzymatic complex I measurements on figure 1Bd).

**Discussion.** We report a patient with CMT carrying simultaneous mutations in *GDAP1* and *MFN2*. Initially, this patient was found to be heterozygous for the p.R468H mutation in *MFN2*. Individuals carrying this mutation usually have mild CMT phenotype or are asymptomatic.<sup>7</sup> Hence the sole presence of this mutation could not be responsible for the severe clinical phenotype,<sup>7</sup> suggesting the need for further genetic analysis, which revealed the existence of the p.Q163X homozygous mutation in *GDAP1* as an explanation of the clinical severity.

We have previously reported that *MFN2* mutations resulted in an energy coupling defect with normal mitochondrial ATP production,<sup>4,5</sup> whereas dominant mutation in *GDAP1* resulted in defective complex I activity with a decrease in ATP production when complex I substrates (malate and pyruvate) were used.<sup>6</sup> A compensatory mechanism was postulated since the production of ATP was normal when succinate, the complex II substrate, was used (figure 1Bb). In a patient carrying mutations in *GDAP1* and *MFN2*, we showed defective complex I activity as well as severe mitochondrial uncoupling. Interest-

Supplemental data at  
[www.neurology.org](http://www.neurology.org)

**Figure 1** Genetic and biochemical findings



(A) Pedigree of a family with Charcot-Marie-Tooth disease (CMT) showing the distribution of the nonsense p.Q163X mutation in *GDAP1* and the missense p.R468H mutation in *MFN2*. Clear circles: unaffected females; clear squares: unaffected males; black circle: affected female; and black squares: affected males; m: mutant alleles; and wt: wild-type alleles. The arrow indicates the proband. (B) Biochemical findings. (a) Coupling efficiency (ATP/O), i.e., rate of ATP produced per nanomole of oxygen consumed with malate (M), pyruvate (P), and succinate (S) as substrates. (b) Mitochondrial ATP production with MPS. (c) Rate of oxygen consumption with malate pyruvate (MP) or MPS, or with S/Rotenone (R), a mitochondrial complex I inhibitor. (d) OxPhos enzymatic activities were normalized with the citrate synthase (CS) activity, a reference mitochondrial content. The results are expressed as mean values  $\pm$  SD of 3 independent measurements. Statistical significance levels applied to the control, *MFN2*, and *GDAP1* groups: \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ . Control group  $n = 7$ ; *MFN2* group  $n = 10$  (7 different *MFN2* mutations); *GDAP1* group  $n = 3$  (p.C240Y mutation). See e-Methods for more information.

ingly, the reduction of complex I activity was similar to that of fibroblasts with the dominant *GDAP1* mutation. In addition, the ATP production with complex I and complex II substrates was significantly reduced compared to fibroblasts harboring either the *MFN2* or *GDAP1* mutations alone (figure 1Bb). These findings underscore the role of *GDAP1* in the function of respiratory complex I and suggest that this combination of mutations has biochemical deleterious synergistic effects. In *MFN2* patients, the mitochondrial uncoupling was associated with a higher respiratory rate involving complex II, serving as a compensatory mechanism (MPS value, figure 1Bc).<sup>5</sup> However, in *MFN2-GDAP1* double

mutant fibroblasts, the complex I defect may have limited such compensation, leading to a decrease in ATP production.

Finally, our study suggests that the clinical heterogeneity of CMT may be related to the simultaneous presence of mutant alleles in different CMT genes, emphasizing the need for extensive genetic investigation to provide accurate diagnosis.

From UMR INSERM (J.C., N.G., P.R., D.B., P.A.-B., V.P., A.C.), U771-CNRS6214, Angers; Departments of Neurology (J.C.) and Biochemistry and Genetics (N.G., M.-C.M., P.R., D.B., P.A.-R., V.P., A.C.), University Hospital of Angers, Angers; School of Medicine (J.C., V.G., P.R., D.B., V.P.), University of Angers, Angers, France; Neuromuscular Unit (C.C.), Neurology Department, Hospital Universitari de Bellvitge-IDIBELL, Barcelona; Molecular

Genetic Diagnosis Center of Inherited Disease-IDIBELL (C.C., I.B., V.V.), Barcelona; and Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Degenerativas (CIBERNED) (C.C.), IDIBELL, Barcelona, Spain.

Disclosure: The authors report no disclosures.

Received September 13, 2010. Accepted in final form November 18, 2010.

Address correspondence and reprint requests to Dr. Vincent Procaccio, Biochemistry and Genetics Laboratory, National Centre for Neurodegenerative and Mitochondrial diseases, CHU Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France; [ViProcaccio@chu-angers.fr](mailto:ViProcaccio@chu-angers.fr)

Copyright © 2011 by AAN Enterprises, Inc.

## ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Kanaya Malkani for critical reading and comments on the manuscript and Juana Fernández-Rodríguez for technical assistance.

1. Cartoni R, Martinou JC. Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp Neurol* 2009;218:268–273.
2. Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 2005;170:1067–1078.
3. Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, et al. Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease involving GDAP1 mutations. *Exp Neurol* 2011;227:31–41.
4. Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, et al. Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* 2007;61:315–323.
5. Guillet V, Gueguen N, Verny C, et al. Adenine nucleotide translocase is involved in a mitochondrial coupling defect in MFN2-related Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Neurogenetics* 2010;11:127–133.
6. Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, et al. Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics* 2009;10:145–150.
7. Casanovas C, Banchs I, Cassereau J, et al. Phenotypic spectrum of MFN2 mutations in the Spanish population. *J Med Genet* 2010;47:249–256.

**e-Methods**

**Cell lines and mutation analyses**

Blood samples were collected from nine members of the family after informed consent was obtained. DNA was PCR-amplified (primer sequences available on request) to screen the complete sequence of *GDAP1*, *P0*, *PMP22*, *EGR2*, *MFN2* and *GJB1* genes. PCR products were sequenced using the ABI Prism BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA).

Primary dermal fibroblasts were obtained from skin biopsies taken after getting written consent from patient II-5. Fibroblasts were maintained in DMEM/10% bovine calf serum (BCS) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. All fibroblast cultures were mycoplasma-free, as shown by the DAPI/Hoechst in situ coloration and by PCR (Venor®Gem, BioValley, Marne-la-Vallée, France). All experiments were carried out on cells with similar passage numbers, ranging from 5 to 15, so as to avoid artefacts due to senescence, i.e. at passage numbers >30.

**Deconvolution microscopy and mitochondrial network analysis**

Mitochondria were labelled using Mitotracker® Green (Molecular Probes, CA, USA). Fibroblasts were pulse-loaded with 100nM Mitotracker® Green for 15 min in a humidified atmosphere (95% air, 5% CO<sub>2</sub>) at 37°C. After loading, cells were thoroughly washed with DMEM without red phenol, 1% FCS. For imaging, coverslips were placed on the stage of an inverted microscope. Images were acquired with a inverted wide-field Leica (DMI6000B, Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a Roper CoolSnap HQ2 camera (Roper Scientific, Tucson, AZ, USA) a high-sensitivity CCD camera for quantitative fluorescence microscopy. A precision, piezoelectric driver mounted underneath the objective lens allows faster Z-step movements, keeping the sample immobile while shifting the objective lens. An average of 30 planes images were acquired along the Z-axis at 0.2 µm increments. Metamorph® 7.6 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) were used for image acquisition. We use point-spread function (PSF)-Speck microspheres for testing the optical stability of our system. Image restoration algorithms can be used to reassign the optical blur to its original location (Huygens software, Scientific Volume Imaging, Hilversum, The

Netherlands). Each successive iteration leads to a new estimation closer to the real object. At the end of the iterative process, the blur is reduced and the signal considerably increased in the regions of the structures of interest. Imaris 6.3® software (Bitplane, Zurich, Switzerland) for 3D processing and morphometric analysis.

### **Mitochondrial biochemistry**

**Enzymatic Activities.** Mitochondrial respiratory chain complex activities were measured on cell homogenates using a Beckman DU 640 spectrophotometer (Beckman coulter, Fullerton, CA, USA) as described elsewhere.<sup>4</sup>

**Efficiency of Mitochondrial ATP Production in Permeabilized Cells.** The rate of mitochondrial ATP synthesis and the ATP/O ratio were determined in cells permeabilized by digitonin exposure as previously described.<sup>4</sup> Cells were resuspended in the respiratory buffer (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM mannitol, 10 mM KCl and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4) supplemented with 2 mM iodoacetate and 2 mM EDTA, so as to prevent glycolytic ATP synthesis and ATP hydrolysis by cellular ATPases. The respiratory rates of 3-5\*10<sup>6</sup> cells were recorded at 37°C in 1.5 ml glass chambers using a two-channel, high-resolution Oxygraph respirometer (Oroboros, Innsbruck, Austria). ATP synthesis was started by addition of 5 mM malate and 5 mM pyruvate and the subsequent addition of 1.5 mM ADP. Four aliquots were sampled each minute and quenched with an equal volume of 1% TCA solution and neutralized by adding a 25 mM HEPES, 2 mM EDTA, pH 7.75 buffer. The ATP synthesized in situ was measured using the Enliten ATP assay (Promega, Madison, WI, USA). Luminescence was measured on a multidetection reader for microplates Xenius XML (SAFAS, Monaco) using a 10-second integration period. Standardization was performed with known quantities of ATP measured under the same conditions.

The results obtained in patient II-5 were compared with those obtained from seven normal controls, from three patients heterozygous for the p.C240Y mutation in *GDAP1* and from ten patients harbouring seven different *MFN2* mutations (p.M21V, p.R94Q, p.T105M, p.A166T, p.R364Q, p.E744A and p.R468H). The biochemical findings obtained for the patient II-8 carrying the p.R468H mutation were previously published.<sup>7</sup>

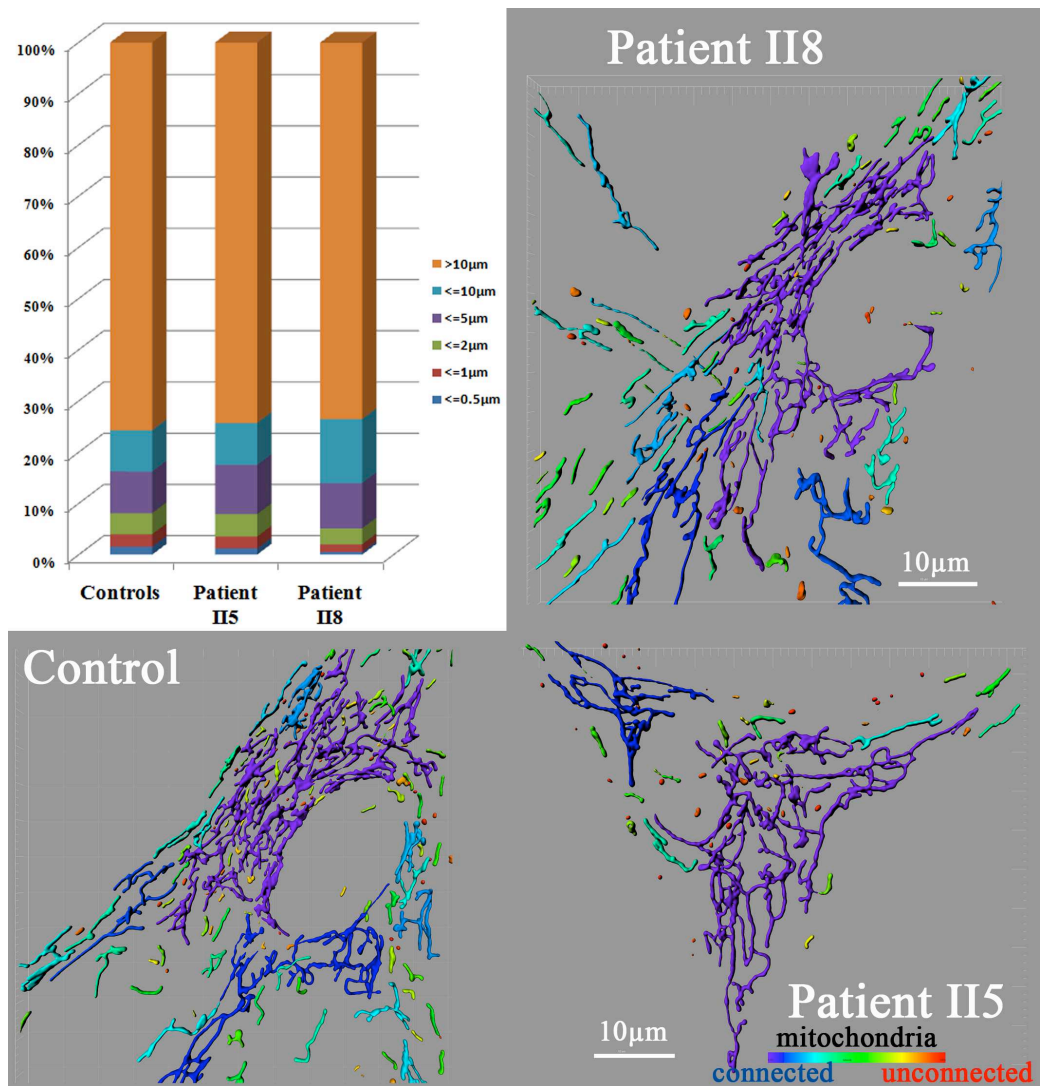
### **Statistical analysis**

Mann-Whitney tests were used for statistical comparisons with differences considered significant at  $p < 0.05$ .

Table e-1: Electrophysiological findings of Patient II-5 (simultaneous GDAP1:Q163X and MFN2:R468H mutations) compared to those of Patient II-8 (MFN2:R468H mutation).

	Stimulation	Recording	Patient II-5	Patient II-8
Sensory nerves amplitude potentials ( $\mu$ V)/ nerve conduction velocity (m/s)				
left sural nerve	calf	lateral malleolus	NR	NR
right sural nerve	calf	lateral malleolus	NR	NR
left median nerve	wrist	digit II	NR	16.6 (N>18)/47.8 (N>47)
right median nerve	wrist	digit II	NR	15.6 (N>18)/49.6 (N>47)
Compound motor action potentials (mV)/ nerve conduction velocity (m/s)				
left peroneal nerve	ankle	extensor digitorum brevis	NR	2.8 (N>2)/41.4 (N>42)
right peroneal nerve	ankle	extensor digitorum brevis	NR	2.9 (N>2)/42 (N>42)
left median nerve	wrist	abductor pollicis brevis	0.1 (N>6)/43 (N>50)	7.1 (N>6)/48.3 (N>50)
right median nerve	wrist	abductor pollicis brevis	NR	6.2 (N>6)/51.4 (N>50)
Facial nerve compound motor action potential (mv)/ distal latency (ms)				
right facial nerve	preauricular	nasalis	1.2 (N>0.1)/3.85 (N<4)	3.1 (N>0.1)/2.7 (N<4)
left facial nerve	preauricular	nasalis	1.1 (N>0.1) /3.7 (N<4)	3.3 (N>0.1)/2.5 (N<4)
Right blink reflex (ms)				
R1 compound latency			16.6 (N<13)	11.2 (N<13)
R2 compound latency			36.1 (N<39)	28.6 (N<39)
R3 compound latency			38 (N<40)	31.2 (N<40)

N, normal value; NR, not recordable



**Figure e-1: Fluorescence imaging**

No alteration of the mitochondrial network was found in MFN2:p.R468H mutated fibroblasts and in MFN2:p.[R468H]+GDAP1:p.[Q163X] mutated fibroblasts.

The diagram bar shows the distribution of mitochondrial length (mean of 40 images). Representative images are shown. A color code highlights the connectivity of the mitochondrial network.

## 1.4. Résultats et discussion

### ● Article 1

Dans notre première étude, nous avons décrit une famille de patients porteurs d'une mutation p.C240Y du gène *GDAP1* non rapportée alors et responsable d'un CMT de forme autosomique dominante. Les arguments en faveur de la pathogénicité de cette mutation étaient la ségrégation parfaite avec la maladie dans la famille, la conservation inter-espèces de l'acide aminé modifié par la mutation au cours de l'évolution et l'absence de cette variation de séquence p.C240Y chez 280 témoins rendant peu probable un polymorphisme.

#### - Défaut de la bioénergétique mitochondriale impliquant le complexe I

Les fibroblastes de peau prélevés chez trois patients CMT2K et six sujets contrôles ont servi de support à notre étude. Nous avons mesuré l'activité des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale et mis en évidence une diminution de 50% de l'activité du complexe I chez les patients. Les mesures des paramètres respiratoires sur cellules perméabilisées ont permis de confirmer ce déficit en mettant en évidence une importante diminution de la vitesse de consommation d'oxygène après injection des substrats du complexe I (malate, pyruvate) en condition saturante en ADP. Cette vitesse est cependant normale lorsqu'on ajoute le substrat du complexe II (succinate). De plus, après administration de roténone (inhibiteur du complexe I), la vitesse de consommation d'oxygène diminue peu, contrairement à ce que l'on peut observer chez les témoins. Cela suggère que la proportion de respiration liée au complexe I est faible par rapport à celle liée au complexe II.

Nous avons mesuré la synthèse d'ATP après administration des substrats du complexe I. Les résultats obtenus chez les patients mettent en évidence, dans ces conditions, une production d'ATP deux fois plus faible que chez les témoins. La synthèse d'ATP est normale lorsqu'on ajoute le substrat du complexe II confirmant que la diminution de la synthèse d'ATP est liée au déficit du complexe I. Cette observation est similaire à celle décrite dans des déficits du complexe I, notamment dans des fibroblastes de patients atteints de neuropathie optique héréditaire de Leber (NOHL) (Chevrollier et al., 2008). En revanche, il n'a pas été mis en



évidence d'altération du rapport ATP/O ce qui signifie qu'il n'y a pas de découplage mitochondrial.

- Fragmentation partielle du réseau mitochondrial et augmentation de la « masse mitochondriale »

Nous nous sommes ensuite intéressés à la morphologie du réseau mitochondrial. L'étude du réseau mitochondrial des fibroblastes en microscopie à fluorescence a mis en évidence chez ces patients une fragmentation partielle du réseau mitochondrial. Nous avons ensuite quantifié la masse mitochondriale par une analyse en image 2D de la surface mitochondriale rapportée à la surface cellulaire. Les résultats obtenus montrent que ce rapport est augmenté dans les fibroblastes des patients pouvant faire suggérer une augmentation de la masse mitochondriale. Ces résultats sont concordants avec l'observation de l'augmentation de l'activité de la citrate synthase (enzyme mitochondriale reflétant le contenu cellulaire en mitochondries) qui a été faite par mesures spectrométriques. Enfin, l'analyse morphologique des mitochondries en microscopie électronique a mis en évidence une augmentation du diamètre mitochondrial de 33% chez les patients.

- Hypothèses physiopathologiques

Cette étude met en évidence un déficit du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale dans les fibroblastes porteurs de la mutation p.C240Y localisée dans un domaine Glutathion-S-Transférase (GST) de la protéine GDAP1, avec une fragmentation partielle du réseau mitochondrial. L'hypothèse émise pour expliquer ces résultats concerne l'éventuel rôle protecteur contre le stress oxydant de la protéine GDAP1. Les GST sont des enzymes très largement distribuées, présentes aussi bien chez les végétaux que chez les animaux et qui jouent un rôle dans la détoxification de diverses molécules (composés électrophiles hydrophobes, superoxydes endogènes, agents alkylants...). Bien qu'une activité GST n'ait pas été prouvée pour GDAP1, l'hypothèse d'une diminution de la protection contre le stress oxydant conduisant à une augmentation de la quantité de radicaux libres (ROS) peut être émise. Les radicaux libres pourraient ainsi avoir une action néfaste sur la peroxydation lipidique, sur l'expression protéique et sur le complexe I directement par oxydation protéique (Ketterer et al., 1988; Zhao et al., 1999) aboutissant à un déficit de ce complexe. Le déficit du complexe I entraîne une diminution du pompage protonique vers l'espace intermembranaire,

une diminution du transfert d'électrons, et une diminution de la synthèse d'ATP. Une autre conséquence possible de ce déficit du complexe I pourrait être la production en excès de radicaux libres par le complexe I qui peut être à la fois la source et la cible de ces radicaux libres.

Le fait que le réseau mitochondrial des patients soit partiellement fragmenté peut être non seulement la conséquence de la mutation de GDAP1 mais également la conséquence d'un déficit du complexe I. Il a été montré qu'il existait un lien étroit entre la morphologie du réseau mitochondrial et la diminution de l'activité du complexe I (Koopman et al., 2007). En effet, dans les fibroblastes de patients porteurs d'un déficit du complexe I lié à des mutations de ses sous-unités constitutives, il a été mis en évidence deux types de réseau mitochondrial en fonction du taux de ROS : la classe 1 avec une fragmentation du réseau et la classe 2 avec un réseau non altéré. La classe 1 est corrélée à un taux de ROS élevé alors que ce taux est plus faible dans la classe 2. Ces mêmes auteurs ont également montré qu'un traitement par un antioxydant, la mitoquinone, permettait de restaurer un réseau mitochondrial normal. Dans les cellules porteuses de la mutation p.C240Y, l'augmentation de la surface mitochondriale pourrait être un effet d'adaptation de la cellule à ces altérations énergétiques.

L'altération métabolique observée dans les fibroblastes des patients CMT2K suggère que la production énergétique de ces cellules est peu appropriée pour faire face à des conditions de demande énergétique accrue. Les cellules neuronales qui doivent mobiliser une importante quantité d'énergie pour propager l'influx nerveux sont certainement plus sensibles dans ces conditions. De plus, la mise en évidence d'anomalie architecturale du réseau mitochondrial fait évoquer une altération de la dynamique mitochondriale. Il est probable que le transport axonal mitochondrial soit altéré par ces perturbations bioénergétiques. Il serait alors intéressant d'étudier le transport axonal mitochondrial dans un modèle neuronal de CMT2K. Une anomalie des mouvements mitochondriaux au sein des axones pourrait intervenir dans le mécanisme de neurodégénérescence comme cela a été montré dans le CMT2A2 lié à des mutations de MFN2 (Baloh et al., 2007).

## ● Article 2

Par la suite, nous avons eu l'opportunité d'étudier les fibroblastes d'un patient porteur à la fois d'une mutation homozygote p.Q163X de *GDAP1* et d'une mutation hétérozygote p.R468H dans *MFN2*. Le phénotype clinique de ce patient était très sévère avec une dépendance au fauteuil roulant survenue avant l'âge de 30 ans et une paralysie des cordes vocales. Dans cette étude, nous avons souhaité, d'une part, vérifier la présence d'un déficit du complexe I chez un patient porteur d'une forme récessive liée à une mutation homozygote de *GDAP1* (AR-CMT2C), et d'autre part, de déterminer si la sévérité clinique pouvait être expliquée par les anomalies bioénergétiques observées. Nous avons comparé les résultats obtenus à un groupe témoin, à un groupe composé des 3 patients porteurs de la mutation p.C240Y dans *GDAP1* et à un groupe de 10 patients *MFN2* porteurs de 7 mutations différentes incluant la mutation p.R468H que nous avons précédemment décrite sur le plan clinique et biochimique (Casasnovas et al., 2010).

### - Effet synergique des mutations *MFN2* et *GDAP1* responsable d'un défaut bioénergétique mitochondrial majeur

Chez ce patient porteur des deux mutations, nous avons retrouvé un découplage mitochondrial majeur avec une réduction de 85% du rapport ATP/O comparé au groupe témoin. Ce découplage est associé à une réduction de 65% de la synthèse d'ATP, qui n'est pas retrouvée dans le groupe de patients *MFN2*. De façon similaire aux patients porteurs de la mutation dominante p.C240Y dans *GDAP1*, nous retrouvons une diminution de 40% de l'activité du complexe I. L'association d'un déficit du complexe I et d'un découplage mitochondrial majeur avec une diminution de la production d'ATP suggère un effet synergique délétère de ces mutations et confirme le rôle de *GDAP1* dans la bioénergétique mitochondriale impliquant le complexe I.

Des études précédentes menées au laboratoire ont permis de mettre en évidence un défaut de couplage chez les patients CMT porteurs de mutations dans *MFN2* (Guillet et al., 2010; Loiseau et al., 2007). La baisse d'efficacité des phosphorylations oxydatives se traduit par une diminution du rapport ATP/O pour l'ensemble des cultures fibroblastiques étudiées, sans que cette diminution du rendement énergétique n'entraîne de déficit de synthèse d'ATP mitochondriale. Il a été montré que la respiration à l'état III des fibroblastes de patients

atteints de CMT2A augmente et que cette augmentation implique essentiellement la respiration liée aux substrats du complexe II (Guillet et al., 2010). La baisse du rapport ATP/O ne semble pas délétère dans les fibroblastes de patients atteints de CMT2A. En effet, les cellules de patients ont une croissance identique à celle des témoins et ne présentent pas de sensibilité accrue à l'apoptose induite par la staurosporine (Loiseau et al., 2007). Dans les cellules neuronales, la synthèse d'ATP serait essentiellement conduite par le complexe I, avec comme substrat énergétique principal des neurones, le glucose (Greene and Winegrad, 1979; Hertz et al., 1988). Or, le maintien de la synthèse d'ATP dans les fibroblastes CMT2A implique essentiellement le complexe II. Dans les neurones, il est donc possible que ce mécanisme compensatoire ne puisse pas se mettre en place et aboutisse à une restriction énergétique. La double mutation conduit à l'association d'un déficit du complexe I et d'un découplage mitochondrial majeur entraînant une diminution de la synthèse d'ATP suggérant une absence de mécanisme compensatoire. Dès lors, il est probable que les cellules neuronales soient plus sensibles à cette altération métabolique en raison de l'importance du complexe I dans la synthèse d'ATP.

#### - Absence d'altération du réseau mitochondrial

Aucune altération du réseau mitochondrial n'a été mise en évidence dans les fibroblastes du patient MFN2:p.[R468H]+GDAP1:p.[Q163X]+[Q163X] contrairement aux fibroblastes des patients porteurs de la mutation p.C240Y où nous avons observé une fragmentation modérée. L'altération architecturale observée chez certains patients semble donc être mutation-dépendante. Il serait nécessaire de réaliser une étude du réseau mitochondrial sur un nombre plus important de patients porteurs de mutations différentes afin d'évaluer l'impact des mutations de *GDAP1* sur la dynamique mitochondriale.

Cette étude a permis de confirmer le rôle de *GDAP1* dans la bioénergétique mitochondriale impliquant le complexe I. Nous avons également pu montrer que l'association de mutations dans *MFN2* et dans *GDAP1* avait un effet synergique délétère sur le métabolisme énergétique pouvant ainsi expliquer la sévérité clinique observée chez ces patients. Enfin, notre étude insiste sur la nécessité d'une enquête génétique approfondie afin d'établir un diagnostic moléculaire précis indispensable au conseil génétique.

## II. Article n°3

Article 3 :

**Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot–Marie–Tooth disease involving GDAP1 mutations.**

Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, Desquiret V, Verny C, Nicolas G, Dubas F, Amati-Bonneau P, Reynier P, Bonneau D, Procaccio V.

Experimental Neurology. 2011,227(1):31-41

## II.1. Introduction

Nous menons depuis 3 années une étude du métabolisme énergétique et de la morphologie mitochondriale sur le CMT lié à des mutations de *GDAP1*. Parallèlement, nous avons réalisé un travail de synthèse de la littérature sur les données cliniques et électrophysiologiques des patients porteurs de mutations de *GDAP1*. Notre analyse précise la corrélation génotype-phénotype et montre que l'atteinte axonale primitive est commune à toutes les mutations décrites. Ce travail de synthèse des données de la littérature a fait l'objet de la première partie du troisième article de la thèse.

Les mutations de *GDAP1* sont responsables de formes récessives (Baxter et al., 2002) ou dominantes (Chung et al., 2008; Claramunt et al., 2005) et il a été montré que les formes récessives étaient beaucoup plus sévères que les formes dominantes avec une perte de la capacité de marche dans les 3 premières décennies (Bernard et al., 2006). Cependant, parmi les formes récessives, en fonction du type de mutation, la sévérité clinique et la rapidité d'évolution n'étaient pas connues. Nous avons analysé les données cliniques rapportées dans la littérature afin d'évaluer la sévérité clinique et l'évolution de la maladie en fonction des différents types de mutations, et afin de déterminer si les mutations les plus sévères se situaient dans des domaines particuliers de la protéine.

A ce jour, plus d'une quarantaine de mutations dans *GDAP1* ont été décrites responsables de formes axonales ou démyélinisantes sur la base des résultats électrophysiologiques et histologiques. Nous avons fait la synthèse de toutes les données électrophysiologiques et histologiques rapportées afin de déterminer si les caractéristiques de ces formes démyélinisantes étaient comparables à celles habituellement rencontrées dans les CMT impliquant des protéines myéliniques. En effet, il nous semble intéressant de connaître la lésion primitive du nerf en cas de mutation de *GDAP1*, afin d'apporter une meilleure compréhension à la physiopathologie de la maladie. Enfin, dans la dernière partie de cet article nous avons discuté les différentes hypothèses envisagées permettant d'expliquer le défaut du complexe I observé chez des patients porteurs de mutations dans *GDAP1*.

## **II.2. Article n°3**

### **Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot–Marie–Tooth disease involving GDAP1 mutations**

Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, Desquiret V, Verny C, Nicolas G, Dubas F,  
Amati-Bonneau P, Reynier P, Bonneau D, Procaccio V.

**Experimental Neurology.**  
**2011, 227(1):31–41**



Review

Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot–Marie–Tooth disease involving *GDAP1* mutations

Julien Cassereau <sup>a,b,c</sup>, Arnaud Chevrollier <sup>a,d</sup>, Naïg Gueguen <sup>a,d</sup>, Valérie Desquiret <sup>d</sup>, Christophe Verny <sup>b,c</sup>, Guillaume Nicolas <sup>b,c</sup>, Frédéric Dubas <sup>b,c</sup>, Patrizia Amati-Bonneau <sup>a,d</sup>, Pascal Reynier <sup>a,c,d</sup>, Dominique Bonneau <sup>a,c,d</sup>, Vincent Procaccio <sup>a,c,d,\*</sup>

<sup>a</sup> UMR INSERM, U771-CNRS6214, F-49933 Angers, France

<sup>b</sup> University Hospital of Angers, Department of Neurology, Angers, F-49933, France

<sup>c</sup> University of Angers, School of Medicine, Angers, F-49933, France

<sup>d</sup> University Hospital of Angers, Department of Biochemistry and Genetics, Angers, F-49933, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 June 2010  
 Revised 2 September 2010  
 Accepted 4 September 2010  
 Available online 21 September 2010

Keywords:

Charcot–Marie–Tooth  
*GDAP1*  
 Mitochondria  
 Mitochondrial fission  
 Complex I

ABSTRACT

Charcot–Marie–Tooth (CMT) disease represents a large group of clinically and genetically heterogeneous disorders leading to inherited peripheral neuropathies affecting motor and sensory neurons. Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated-protein 1 gene (*GDAP1*), which encodes a protein anchored to the mitochondrial outer membrane, are usually associated with the recessive forms of CMT disease and only rarely with the autosomal dominant forms. The function of *GDAP1* is not fully understood but it plays a role in mitochondrial dynamics by promoting fission events. We present an overview of *GDAP1* and the corresponding protein together with the complete spectrum of the 41 gene mutations described so far. We examine the relationship between the genotype and the phenotype in the various forms of CMT disease related to *GDAP1* mutations, and discuss the pathophysiological hypotheses that link peripheral neuropathies to mitochondrial dysfunction and *GDAP1* mutations. The meta-analysis of the literature reveals the great heterogeneity of phenotypic presentations and shows that the recessive forms of CMT disease, i.e. CMT4A and AR-CMT2, are far more severe than the dominant form, i.e. CMT2K. Among patients with recessive forms of the disease, those carrying truncating mutations are more seriously affected, often becoming wheelchair-bound before the end of the third decade. At the neuronal level, *GDAP1* mutations may lead to perturbed axonal transport and impaired energy production as in other neurodegenerative diseases due to mutations in genes involved in mitochondrial dynamics.

© 2010 Elsevier Inc. All rights reserved.

Contents

Introduction . . . . .	32
<i>GDAP1</i> : gene and protein (Fig. 1) . . . . .	32
Spectrum of <i>GDAP1</i> mutations . . . . .	32
Phenotypic presentations of CMT disease involving <i>GDAP1</i> mutations . . . . .	33
Clinical presentation . . . . .	33
Electrophysiological and histological aspects of CMT disease . . . . .	33
Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of CMT disorders involving <i>GDAP1</i> mutations . . . . .	37
Role of <i>GDAP1</i> in mitochondrial dynamics . . . . .	37
Defective mitochondrial bioenergetics associated with <i>GDAP1</i> mutations. . . . .	38
Conclusion. . . . .	39
Acknowledgments . . . . .	39
References. . . . .	40

\* Corresponding author. Biochemistry and Genetics Laboratory, National Centre for Neurodegenerative and Mitochondrial diseases, CHU Angers, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France. Fax: +33 2 41 35 40 17.  
 E-mail address: [VProcaccio@chu-angers.fr](mailto:VProcaccio@chu-angers.fr) (V. Procaccio).



## Introduction

Charcot–Marie–Tooth (CMT) disease is one of the commonest causes of inherited peripheral neuropathies with a prevalence of about 10–30 per 100,000, depending on the country of origin (Emery, 1991). CMT neuropathies are characterized clinically by progressive sensory loss, weakness, muscle atrophy, loss of deep tendon reflexes, and foot deformities. On the basis of electrophysiological criteria, CMT can be classified in two major categories: type 1 or the demyelinating form, characterized by slow motor median nerve conduction velocity (MNCV) (less than 38 m/s), and type 2 or the axonal form, with a normal or slightly reduced MNCV. The intermediate forms of CMT present intermediate electrophysiological features, i.e. MNCV from 25 to 45 m/s.

To date, about thirty genes have been found responsible for CMT (Banchs et al., 2009). Four of these genes encode mitochondrial proteins, i.e. mitofusin 2 (*MFN2*), ganglioside-induced differentiation-associated-protein 1 (*GDAP1*), heat shock protein beta-8 (*HSPB8*), and heat shock protein beta-1 (*HSPB1*). *MFN2* mutations are responsible for CMT2A2, the commonest form of CMT2. *MFN2*, a mitochondrial transmembrane GTPase, located in the mitochondrial outer membrane, is involved in mitochondrial bioenergetics and contributes to the maintenance of the mitochondrial network by promoting mitochondrial membrane fusion. The pathophysiology of CMT2A2 due to *MFN2* mutations and current hypotheses concerning the deleterious role of mutant *MFN2* in neuronal function have been recently reviewed (Cartoni and Martinou, 2009). Moreover, in other mitochondrial forms of CMT, previous studies have shown that disruption of assembly and aggregation of neurofilaments are the results of *HSPB1* mutations in CMT2F (Evgrafov et al., 2004; Ackerley et al., 2006) and *HSPB8* in CMT2L (Irobi et al., 2004), emphasizing the role of axonal transport in mitochondrial-related CMT diseases.

*GDAP1* mutations are responsible for CMT4A (Baxter et al., 2002), the most frequent recessive subtype of demyelinating CMT; for AR-CMT2 (Cuesta et al., 2002), the axonal recessive subtype; for CMTRIA (Senderek et al., 2003), the intermediate recessive CMT; and for CMT2K (Claramunt et al., 2005; Chung et al., 2008; Cassereau et al., 2009), the rare dominant subtype. Here we present an overview of recent findings on *GDAP1*.

### *GDAP1*: gene and protein (Fig. 1)

The gene locus was first identified on chromosome 8q13–q21 (CMT4A) in Tunisian families, and associated with slow MNCV and hypomyelination detected by nerve biopsy (Ben Othmane et al., 1993). The corresponding gene, *GDAP1*, was identified by Baxter et al. (2002). *GDAP1* was previously identified as one of 10 cDNAs expressed in a differentiated Neuro2a mouse neuroblastoma cell line, in which cholinergic differentiation with neurite sprouting had been induced by transfection of GD3 synthase ( $\alpha$ 2,8 sialyltransferase) cDNA (Liu et al., 1999). This gene, with a length of 23,728 base pairs (bp), contains six exons and five introns. The YY1 transcription factor may participate in the regulation of *GDAP1* expression (Ratajowski and Pulaski, 2009).

Two transcript variants of *GDAP1* have been identified. Transcript variant 1, representing the longer variant, encodes the longer isoform,

designated as isoform a (358 amino acids). Transcript variant 2, encoding isoform b, contains an alternate in-frame exon, uses an alternate splice site in the 5' coding region, and a downstream start codon, compared to transcript variant 1. Isoform b (290 amino acids) has a shorter N-terminal compared to isoform a. mRNA studies using RT-PCR have demonstrated the ubiquitous expression of *GDAP1*, predominantly in nervous tissues (Cuesta et al., 2002). Some authors have found that *GDAP1* is expressed mainly in axons rather than in myelinating Schwann cells (Pedrola et al., 2008) whereas others have observed that *GDAP1* is expressed by motor and sensory neurons in the peripheral nervous system as well as by myelinating Schwann cells (Niemann et al., 2005), suggesting that CMT may primarily affect either Schwann cells or neurons, or both.

Phylogenetic and structural analyses suggest that *GDAP1* belongs to a subfamily of glutathione-S-transferases (GSTs) (Cuesta et al., 2002; Marco et al., 2004; Shield et al., 2006). *GDAP1* has two typical GST domains, domain I (GST-N) at the N-terminal region and domain II (GST-C) at the C-terminal region (Fig. 1). GSTs are known to play a key role in the detoxification and reduction of reactive oxygen species (ROS). These domains were predicted using bioinformatics tools (Cuesta et al., 2002; Marco et al., 2004) and no functional GST activity has been demonstrated so far (Shield et al., 2006; Pedrola et al., 2005). However, the results may have been negative because GST testing was based on the use of an incomplete protein devoid of the transmembrane domain. Indeed, GST activity may require a precise mitochondrial localization of the protein. It has been also shown that *GDAP1* has a single transmembrane domain (TMD) at the extremity of the C-terminal, and a hydrophobic domain (HD) in the flanking C-terminal region (Marco et al., 2004; Wagner et al., 2009). Moreover, *GDAP1* has two additional regions between amino acids 152–164 and 169–195 which are predicted to represent two helices,  $\alpha$ 4 and  $\alpha$ 5, constituting the  $\alpha$ 4– $\alpha$ 5 loop (Fig. 1).

Unlike the case of other proteins containing GTPase and dynamin domains, such as *MFN2*, optic atrophy protein 1 (*OPA1*) and the dynamin-related protein 1 (*Drp1*), the *GDAP1* sequence does not suggest any involvement in mitochondrial dynamics. However, several studies have suggested that *GDAP1* plays a role in mitochondrial fission. Thus, the overexpression of *GDAP1* induces fragmentation of the mitochondrial network counterbalanced by the expression of a dominant negative mutant of *Drp1* or that of fusion proteins mitofusins 1 and 2 (Niemann et al., 2005). The selective inhibition of *GDAP1* by siRNA enhances the tubular aspect of the mitochondrial network (Niemann et al., 2005). Wagner et al. (2009) have shown that the TMD plays a key role in mitochondrial targeting and membrane insertion. Positively charged amino acids flanking the TMD on the cytosolic side control both mitochondrial targeting and the fission function of *GDAP1*. The hydrophobic domain (HD) seems essential for mitochondrial fission mediated by *GDAP1*.

Further studies are needed to better characterize the functional role of the different domains of the protein and to understand how *GDAP1* contributes to mitochondrial fission.

### Spectrum of *GDAP1* mutations

The 41 *GDAP1* mutations currently identified are listed in Table 1, which indicates the locations of the mutations, the phenotypic

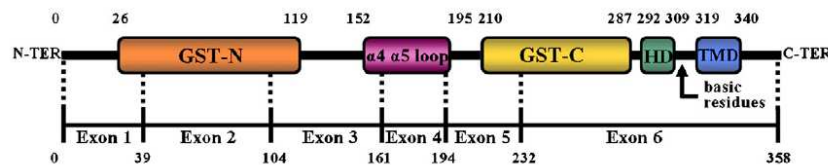


Fig. 1. Schematic representation of the *GDAP1* protein with predicted domains and the *GDAP1* genomic organization with the corresponding exons. The numbering above the *GDAP1* protein indicates the amino acid positions of the structural domains. The numbering below the genomic organization corresponds to the amino acid boundaries of each exon.

features of CMT disease, the number of patients, and their countries of origin. Among the mutations identified, 56% are missense, 17% nonsense, 20% frameshift and 7% splicing mutations (Fig. 2A). According to their location, these mutations may be classified in seven categories: 1) fifteen mutations responsible for premature truncation of the protein affecting highly conserved domains (GST-N, GST-C, HD, TMD, and the  $\alpha 4$ – $\alpha 5$  loop); 2) thirteen missense mutations located in predicted GST domains; 3) three missense mutations affecting the  $\alpha 4$ – $\alpha 5$  loop; 4) one missense mutation in the HD domain; 5) one missense mutation affecting a basic amino acid flanking the transmembrane domain; 6) three splicing mutations, with putative exon skipping, affecting highly conserved domains such as the GST domains or the  $\alpha 4$ – $\alpha 5$  loop; and 7) five mutations not located in any particular domain. These results show that the key domains of the *GDAP1* gene may undergo mutations leading to CMT disease. These mutations, which affect the entire coding sequence of the gene, are more frequently found in exon 3 (14 mutations) and exon 6 (10 mutations) (Fig. 2B). The distribution of mutations in these exons is quite homogeneous. These findings suggest that exons 3 and 6 may be considered as mutational hot spots and their analysis should therefore be given priority during the molecular screening of *GDAP1*.

### Phenotypic presentations of CMT disease involving *GDAP1* mutations

#### Clinical presentation

CMT disease corresponds to a group of genetically heterogeneous disorders that share clinical characteristics including weakness of distal limb muscles, especially involving the peroneal compartment, whence its former appellation of *peroneal muscular atrophy*. These characteristics are usually associated with distal sensory loss, skeletal deformities, and decrease or absence of deep tendon reflexes. The longer muscle fibers, which are affected earlier and more severely than the shorter fibers, produce distal impairment of limb functions, first involving the feet and legs, then the thighs and later, the hands. At the same time, sensory loss first affects the feet, then the legs and later, the hands, usually accompanied by the loss of deep tendon reflexes. The typical skeletal deformities observed in CMT patients are characterized by pes cavus with hammer toes, and less commonly by scoliosis. Onset of the disease usually occurs during the first decades of life with the course progressing slowly over the decades. Some individuals show minimal signs of disease and may even be unaware of being affected, whereas others may be severely disabled.

CMT disease involving *GDAP1* mutations generally leads to aggressive disorders appearing in infancy or early childhood. In most cases, the progression of the disease leads to disabilities before the second decade of life. The presence of vocal cord paresis and diaphragmatic paralysis suggests the clinical diagnosis of CMT4A. This form of CMT disease caused by *GDAP1* mutations is usually transmitted as an autosomal recessive trait. Dominant inheritance is rare and has been reported in only four cases (R120W, T157P, Q218E and C240Y). These dominant forms, which are less severe than the recessive forms, are associated with later onset (after the second decade) and a slower course of the disease. In these cases, patients may be able to walk even after the fourth decade. However, the mutation T157P, affecting the  $\alpha 4$ – $\alpha 5$  loop, is associated with a severe phenotype characterized by early onset and the presence of optic atrophy, suggesting an additional mitochondrial defect. This unusual presentation involving *GDAP1* shows a clinical overlap with CMT2A2 due to *MFN2* mutations associated with visual impairment responsible for bilateral optic atrophy (Zuchner et al., 2006). Interestingly, the most common cause of inherited optic atrophy is caused by mutations in *OPA1* gene. Both *OPA1* and *MFN2* proteins are dynamalike GTPases acting in concert to mediate the mitochondrial membrane fusion process. Moreover, *OPA1* mutations have been recently

associated with additional neuromuscular symptoms including axonal neuropathy in combination with a visual impairment named as optic atrophy 'plus' syndrome (Yu-Wai-Man et al., 2010), highlighting the importance of mitochondrial function for both optic atrophies and peripheral neuropathies.

The recessive forms of CMT disease involving *GDAP1* mutations are severe with early onset during the first decade, i.e. before age 10 as seen in Table 1. The rapid progression of these disorders leads to functional disability, associated with additional clinical features such as a hoarse voice due to vocal cord paresis, diaphragmatic paralysis and facial weakness. However, the phenotypic presentations of patients carrying *GDAP1* mutations are heterogeneous. Regarding the age of onset and the age of functional disability, there is not only a large clinical variability among patients carrying the same mutations (Moroni et al., 2009) but also a significant intrafamilial variability (Azzedine et al., 2003; Sahin-Calapoglu et al., 2009). Based on the literature, we have compared the description of patients carrying either two truncating mutations or two missense mutations, i.e. homozygous or compound heterozygous mutations. The severity of the disease was judged by the patients' ability to walk without support, with the aid of an orthosis or crutch, or being wheelchair-bound. Among the patients carrying two truncating mutations, all patients required an aid for walking after age 10, and wheelchairs were generally needed before the end of the third decade.

In contrast, among the patients carrying two missense mutations, walking was often still possible up to the third decade. The most severe missense mutations appeared to be the P78L, P153L, R161H and Y279C mutations, with wheelchair dependence being almost general in the second decade. Interestingly, two of the mutations, i.e. P153L and R161H, affect the  $\alpha 4$ – $\alpha 5$  loop, which seems to play an important role in *GDAP1* function. The amino acids P78 and Y279 are located in the predicted GST-N and GST-C domains respectively (Table 1).

In the recessive forms of CMT disease, vocal cord paresis is a common symptom (Sevilla et al., 2008) and generally appears after the second decade. Our meta-analysis shows that 80% of these patients carried at least one truncating mutation, the Q163X mutation being present in 40%. The missense mutations linked with vocal cord paresis are the P78L, R120Q, P153L, Y279C and R310Q mutations (Table 1).

Despite the limited number of patients described so far, our analysis shows that the recessive forms of CMT disease involving *GDAP1* mutations are far more severe than the dominant forms. Among these recessive forms, patients carrying two truncating mutations have a more severe phenotype and more rapid disease progression compared to patients carrying two missense mutations. However, a greater number of cases of CMT disease involving *GDAP1* mutations, along with detailed clinical, electrophysiological and pathological data, will be required to establish a reliable relationship between the genotype and phenotype of the different forms of the disease.

#### Electrophysiological and histological aspects of CMT disease

On the basis of electrophysiologic criteria, CMT disease may be classified in two major categories: CMT1, the demyelinating form, characterized by slow motor median nerve conduction velocity (MNCV), i.e. less than 38 m/s; and CMT2, the axonal form, with a normal or only slightly reduced MNCV. However, major axonal loss is known to reduce the MNCV and if the axonal and demyelinating features of the disease exist simultaneously, this electrophysiological classification loses its value. The cut-off value of MNCV should be adjusted according to the compound motor action potential (CMAP), such that the MNCV < 32 m/s when the CMAP < 4 mV, as proposed for acquired demyelinating neuropathies (American Academy of Neurology, 1991). In fact, *GDAP1* mutations have been involved in the demyelinating forms (Baxter et al., 2002; Ammar et al., 2003;

**Table 1**  
Reported mutations in *GDAPI1*.

Nucleotide change	Location	Amino acid change	Domain	Number of patients described	Age of onset	Walking ability	Additional symptoms	Electromyography		Histological features	Origin	References
								MNCV (m/s)	CMAP (mV)			
<i>Dominant forms</i>												
c[358C>T]+[=]	Ex 3	p[R120W]+[=]	None	2 (2 families)	2nd decade	WI (35 years)		Normal (35 years)	Normal	ND	Spanish	Claramunt et al. (2005)
c[469A>C]+[=]	Ex 3	p[T157P]+[=]	α4-α5 loop	1	1 year	WI (10 years)	Optic atrophy	45	15	ND	Spanish	Claramunt et al. (2005)
c[652C>G]+[=]	Ex 5	p[Q218E]+[=]	GST-C	2	16–25 years	WI (36–68 years)		47–51 (36–68 years)	4.4–8.8	AX (68 years)	Korean	Chung et al. (2008)
c[719G>A]+[=]	Ex 6	p[C240V]+[=]	GST-C	3	2nd–5th decade	WI: 2p (70–80 years) WS: 1p (50 years)		>50	6–15	ND	French	Cassereau et al. (2009)
<i>Recessive forms</i>												
<i>Truncating/truncating</i>												
c[92G>A]+[92G>A]	Ex 1	p[W31X]+[W31X]	GST-N	ND	1 year	ND		27–31	ND	DM	Tunisian	Baxter et al. (2002)
c[174_176delinsTGTG]+[174_176delinsTGTG]	Ex 2	p[L58LfsX]+[L58LfsX]	GST-N	1	1–2 years	WI (8 years)		40	2.6	ND	Turkish	Auer-Grumbach et al. (2008)
c[295C>T]+[295C>T]	Ex 2	p[Q99X]+[Q99X]	GST-N	4	2 years	WI: 1p (9 years) WS: 2p (9–11 years) W-B: 1p (13 years) WI (4 years)	VCP (2p)	50–56 (3 years)	0.8–1.1	ND	Italian	Moroni et al. (2009)
c[342_345del]+[487C>T]	Ex 3+ Ex 4	p[E114fsX]+[Q163X]	GST-N α4-α5 loop	1	10 months	WS (7 years)		32 (4 years)	9	ND	Spanish	Claramunt et al. (2005)
c[349_350insT]+[349_350insT]	Ex 3	p[T117fsX]+[T117fsX]	GST-N	2	1 year	WS (7 years)		26–31 (6 years)	0.3–0.5	AX/DM	Turkish	Senderek et al. (2003)
c[439del]+[439del]	Ex 3	p[T147fsX]+[T147fsX]	None	2	2–2.5 years	WS (<6 years)		33.7–42.3 (2–3 years)	0.7–0.8	DM (4 years)	Iranian	Georgiou et al. (2006)
c[485-2A>G]+[485-2A>G]	Int 3	p[S162fsX]+[S162fsX]	α4-α5 loop	2	<7 years	ND	Hand retraction	20 (5 years)	0.48	DM/AX	Algerian	De Sandre-Giovannoli et al. (2003)
c[487C>T]+[487C>T]	Ex 4	p[Q163X]+[Q163X]	α4-α5 loop	4	2 years	WS: 1p (43 years) W-B: 3p (30 years)	VCP (2p)	41–44	0.8–1.4	ND	Spanish	Cuesta et al. (2002)
				1	1.5 years	W-B (12 years)	VCP	35 (2 years)	3	AX (2.5 years)	Spanish	Claramunt et al. (2005)
				3	14–18 months	W-B: 2p (7–10 years) ND: 1p	VCP (2p)	Normal (2 p) UD (1 p)	Normal UD	AX	Spanish	Claramunt et al. (2005)
				5 (3 families)	1 year	ND	VCP (1p) FP	43 (1 patient) UD (4 patients)	ND	DM	Costa Rican Peruvian	Boerkoel et al. (2003)
c[487C>T]+[581C>G]	Ex 4+ Ex 5	p[Q163X]+[S194X]	α4-α5 loop	3	<2 years	W-B (12 years)	VCP (3p)	UD	UD	AX (22 years)	Spanish	Cuesta et al. (2002)
				1	<1 year	W-B (9 years)	VCP (2p)	UD	UD	AX (19 years)	Spanish	Sevilla et al. (2003)
				2	<1 year	W-B (25 years)	VCP, DP	UD (32 years)	UD	ND	French	Stojkovic et al. (2004)
c[558del]+[558del]	Ex 4	p[I186fsX]+[I186fsX]	α4-α5 loop	2	<1 year	W-B (25 years)	VCP, DP	UD (32 years)	UD	ND	French	Stojkovic et al. (2004)
c[581C>G]+[581C>G]	Ex 5	p[S194X]+[S194X]	α4-α5 loop	ND	1 year	ND		31	ND	DM	Tunisian	Baxter et al. (2002)
				2	<1 year	ND		42 (3 years)	1.9	AX	Moroccan	Nelis et al. (2002)
				4	<3 years	WS: 3p (13–15–20 years) W-B: 1p (16 years)		40 (1p) UD (3p)	3.8	AX (15 y)	Moroccan	Birouk et al. (2003)
				7 (5 families)	2–6 years	WI: 3p (4–5 years) WS: 2p (4–10 years) W-B: 2p (11–38 years) W-B (13 years)	VCP	35–54	0.3–1.3	ND	Moroccan	Bouhouche et al. (2007a)
c[581C>G]+[863insA]	Ex 5+ Ex 6	p[S194X]+[T288fsX]	α4-α5 loop	1	2 years	W-B (12 y–18 years)	VCP	UD (13 years)	UD	ND	Spanish	Claramunt et al. (2005)
				2	<1 year	W-B (12 y–18 years)	VCP	46 (3 years) UD (45 years)	0.4 (3 years) UD (45 years)	ND	Spanish	Sevilla et al. (2008)
c[668T>A]+[668T>A]	Ex 5	p[L223X]+[L223X]	GST-C	1	1 year	ND	Finger retraction	40 (1.5 years)	1.4	DM/AX	Lebanese	De Sandre-Giovannoli et al. (2003)
c[786del]+[786del]	Ex 6	p[G262fsX]+[G262fsX]	GST-C	2 (2 families)	1–3 years	WS (20 years)		21 (2 years) UD (16 years)	UD	DM (7 years)	Turkish	Nelis et al. (2002)
c[863insA]+[863insA]	Ex 6	p[T288fsX]+[T288fsX]	None	1	1.5 years	W-B (14 years)	VCP, FP, DP	70 (8 years)	0.6	ND	Spanish	Sevilla et al. (2008)
<i>Missense/missense</i>												
c[233C>T]+[233C>T]	Ex 2	p[P78L]+[P78L]	GST-N	4 (2 families)	<2 years	WS: 2p (8 y–15 years) W-B: 2p (6 y–15 years)	H (2p)	13.2–24.5 (7–8 years)	0.3–0.4	ND	Moroccan	Bouhouche et al. (2007b)
c[347T>C]+[347T>C]	Ex 3	p[M116T]+[M116T]	GST-N	2	3–5 years	WS (30 years)		53–62 (5 years)	9	AX	Polish	Kabzinska et al. (2006)
c[347T>C]+[715C>T]	Ex 3+ Ex 6	p[M116T]+[L239F]	GST-N GST-C	2	5–10 years	WI (8–12 years)		59.7	3.8	ND	Polish	Kabzinska et al. (2010)
c[347T>G]+[347T>G]	Ex 3	p[M116R]+[M116R]	GST-N	4 (3 families)	1–7 years	WS: 3p (16–19–26 years) ND: 1p		29–51 (9–13 years)	<0.1–3.6	AX (5–15 years)	Italian	Di Maria et al. (2004)
				2	5–6 years	WI (12–18 years)	Pyramidal signs	48–51 (12–18 years) 19 (33 years)	2.7–6.1	DM	Italian	Biancheri et al. (2006)
c[358C>T]+[811G>A]	Ex 3+ Ex 6	p[R120W]+[G271R]	GST-C	1	3 years	W-B (20 years)		19 (33 years)	0.2	ND	Belgian	Ammar et al. (2003)
c[359G>A]+[359G>A]	Ex 3	p[R120Q]+[R120Q]	None	1	2 years	ND	VCP, FP	UD	UD	AX/DM	Japanese	Boerkoel et al. (2003)
c[364C>A]+[891C>G]	Ex 3+ Ex 6	p[Q122K]+[N297K]	HD	1	2.5 years	WI (14 years)		50 (3 years)	9	ND	Italian	Moroni et al. (2009)
c[445G>T]+[445G>T]	Ex 3	p[D149Y]+[D149Y]	None	1	3 years	W-B (60 years)		UD (63 years)	UD	AX/DM (63 years)	ND	Parman et al. (2004)
c[458C>T]+[458C>T]	Ex 3	p[P153L]+[P153L]	α4-α5 loop	1	3.5 years	W-B (27 years)	H	31 (5 years)	0.15	AX (5 years)	Polish	Kabzinska et al. (2007)
				1	1 year	ND		ND	ND	ND	Turkish	Auer-Grumbach et al. (2008)
c[482G>A]+[482G>A]	Ex 3	p[R161H]+[R161H]	α4-α5 loop	ND	1 year	ND		27–31	ND	ND	Tunisian	Baxter et al. (2002)
				3	5 years	W-B (adolescence)		ND	ND	DM (5 years)	Tunisian	Ammar et al. (2003)
c[656T>A]+[891C>G]	Ex 5+ Ex 6	p[V219D]+[N297K]	GST-C	1	2.5 years	WI (9 years)		25 (5 years)	0.3	ND	Italian	Moroni et al. (2009)
ND	Ex 5+ Ex 6	p[N227D]+[L239F]	GST-C	2	4–10 years	WI (20–23 years)		38–44	3–4.3	ND	Bulgarian	Kabzinska et al. (2010)
c[692C>T]+[692C>T]	Ex 5	p[P231L]+[P231L]	GST-C	3	Childhood	WI (25 years)		49	11.5	ND	Amish	Xin et al. (2008)
c[715C>T]+[715C>T]	Ex 6	p[L239F]+[L239F]	GST-C	1	<5 years	W-B (30 years)		63 (24 years)	0.7	AX	Polish?	Kabzinska et al. (2006b)
				1	5 years	WI (6 years)		46.1 (8 years)	4.2	ND	Turkish	Rougeot et al. (2008)
				3 (2 families)	2–5 years	WI: 1 p (18 years) W-B: 2p (18–34 years)	Finger tremor	51.7–55	4.2–4.3	ND	Polish	Kabzinska et al. (2010)
				2	4 years	WI: 1p (11 years) WS: 1p (35 years)		59–64 (43 y–8 years)	8.8–6.4	ND	Czech	Barankova et al. (2007)
c[715C>T]+[817C>G]	Ex 6	p[L239F]+[R273G]	GST-C	1	2 years	WI (25 years)	H hand tremor	52.1	0.1	ND	Polish	Kabzinska et al. (2010)

(continued on next page)

**Table 1** (continued)

Nucleotide change	Location	Amino acid change	Domain	Number of patients described	Age of onset	Walking ability	Additional symptoms	Electromyography		Histological features	Origin	References
								MNCV (m/s)	CMAP (mV)			
<i>Recessive forms</i>												
<i>Missense/missense</i>												
c[715C>T]+[844C>T]	Ex 6	p.[L239F]+[R282C]	GST-C	2	2–3 years	WI (5–8 years)		55–63	0.9–4.2	ND	Polish	Kabzińska et al. (2010)
c[836A>G]+[836A>G]	Ex 6	p.[Y279C]+[Y279C]	GST-C	4	3–8 years	WS: 1p (32 years) W-B: 3p (10–20 years) WS (5–36–50 years)	H (1p)	U D (19–22 years) 43.5 (2.5 years)	UD	ND	Turkish	Sahin-Galapoglu et al. (2009)
c[844C>T]+[844C>T]	Ex 6	p.[R282C]+[R282C]	GST-C	3	1 year–5 years and adolescence 4 years	WS (13 years)		43–61 (8 years)	1.5–1.4	ND	Turkish	Nelis et al. (2002)
				2	2.5–4 years	WI (11–14 years)		43 (5 years) UD (11 years)	2 (5 years) UD (11 years)	DM (4 years)	Croatian	Ammar et al. (2003)
				1	8 years	WI (45 years)		50 (45 years)	6.3	ND	Spanish	Sevilla et al. (2008)
				1	ND	ND		ND	ND	ND	German	Senderek et al. (2003)
<i>Truncating/missense</i>												
c[233C>T]+[581C>G]	Ex 2 + Ex 5	p.[P78L]+[S194K]	GST-N	2	<2 years	WI: 1p (4 years) WS: 1p (6 years)		22–45.6 (6–4 years) 41	0.2–1.8	ND	Moroccan	Boubouche et al. (2007b)
c[341_344del]+[715C>T]	Ex 3 + Ex 6	p.[E1146X]+[L239F]	GST-N GST-C	1	1 year	W-B (11 years)			0.7	AX/DM	German/ Italian	Ammar et al. (2003)
c[373C>T]+[715C>T]	Ex 3 + Ex 6	p.[R125X]+[L239F]	GST-C	2	2.5 years	WS (7 and 10 years)		52–60 (3 years)	4.7–6.7	AX (3.5 years)	Italian	Moroni et al. (2009)
c[571C>T]+[715C>T]	Ex 4 + Ex 6	p.[R191X]+[L239F]	α4–α5 loop GST-C	1	2 years	WS (13 years)		UD (15 years)	UD	ND	Czech	Barankova et al. (2007)
				1	1 year	ND		44	3.5	ND	Austrian	Auer-Grumbach et al. (2008)
c[581C>G]+[929G>A]	Ex 5 + Ex 6	p.[S194X]+[R310Q]	α4–α5 loop	2	3 years	WS: 1p (26 years) W-B: 1p (15 years)	VCP, DP	47 (26 years)	1.2	ND	Moroccan	Azzedine et al. (2003)
<i>Others</i>												
c[172_173delinsTTA]+[311-1G>A]	Ex 2 + Int 2	p.[P59AfsX]+[3'-splice site]	GST-N	1	<1 year	W-B (18 years)	VCP	53	0.3	AX	Spanish	Sevilla et al. (2008)
c[311-1G>A]+[389C>G]	Int 2 + Ex 3	p.[3'-splice site]+[S130K]	GST-N	1	3 years	WI (10 years)		56.7 (10 years)	2.5	AX	Polish	Kabzińska et al. (2005)
c[571C>T]+[?]	Ex 4 + ?	p.[R191X]+[?]	α4–α5 loop	2	6 years	WI (22 years)		45 (23 years)	7.1	ND	Czech	Barankova et al. (2007)
c[715C>T]+[?]	Ex 6 + ?	p.[L239F]+[?]	GST-C	1	4 years	WI (41 years)		53 (41 years)	8.2	ND	Czech	Barankova et al. (2007)
c[579 + 1G>A]+[579 + 1G>A]	Int 4	[5'-splice site]+[5'-splice site]	α4–α5 loop	1	2 years	WS (6 years)		26.4 (5 years)	0.3	AX/DM (2 years)	German	Senderek et al. (2003)

**Abbreviations:** MNCV: motor nerve conduction velocity of the median nerve (age at electrophysiological examination); CMAP: compound motor action potentials; WI: walking independently (age at last clinical examination); WS: walking with support; crutches or orthosis (age at last clinical examination); W-B: wheelchair-bound (age of wheelchair dependency); VCP: vocal cord paresis; H: hoarseness; DP: diaphragmatic paralysis; FP: facial paralysis; AX: axonal; DM: demyelinating (age at nervous biopsy); ND: not done; UD: undetectable; p: patients.  
**Nomenclature:** the nomenclature of the mutations described follows the recommendations of the Human Genome Variation Society: <http://www.hgvs.org/mutnomen> (den Dunnen and Antonarakis, 2000; den Dunnen and Paalman, 2003).

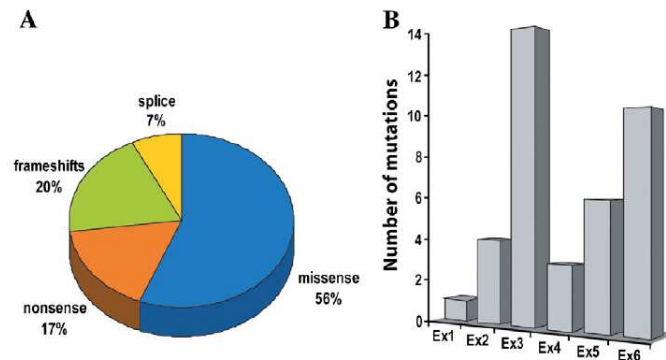


Fig. 2. Types and frequencies of *GDAP1* mutations. A. Diagram representing the different types and percentages of mutations associated with *GDAP1*. B. Distribution of the 41 pathogenic mutations in the *GDAP1* gene. Ex: exon.

Boerkoel et al., 2003; Parman et al., 2004; Georgiou et al., 2006), as well as in the intermediate forms (Senderek et al., 2003) of CMT disease. The MNCVs appeared to be less reduced and the amplitudes were lower than would be expected in cases of dominant demyelinating CMT1 (such as CMT1A and CMT1B) (Hattori et al., 2003; Birouk et al., 1997; Lewis et al., 2000) or in other recessive demyelinating forms, such as CMT4 (Dubourg et al., 2006). In these demyelinating forms of CMT disease, the MNCVs fell sharply to <25 m/s, before the age of two, and remained stable, whereas the amplitudes that were initially normal progressively decreased over time following secondary axonal loss. In the demyelinating forms associated with the *GDAP1* mutations described so far, no cases of reduced velocities occurring simultaneously with amplitudes in the normal range were reported. All reduced velocities were associated with major amplitude reductions, often to less than 0.5 mV. Thus, *GDAP1*-associated demyelinating forms of CMT disease appear to present a phenotype differing from that described in other demyelinating forms of the disease.

The histopathological analysis of nerve biopsies in cases of CMT disease involving *GDAP1* mutations generally revealed a loss of large myelinated fibers and a variable appearance of thin myelinated fibers. The demyelination feature, characterized by the proliferation of Schwann cells with onion-bulb formations, was observed only in the most severe cases, with significantly diminished CMAP. Moreover, the electrophysiological characteristics usually worsened with time, suggesting that the variability of electrophysiological and histopathological data observed may reflect the severity and the stage of the disease progression that differ for each patient. The loss of larger fibers may explain the lower MNCV reduction found even in cases where the histopathology favored the existence of an axonal neuropathy. These observations suggest that CMT-associated *GDAP1* mutations lead to severe neuropathy with axonal degeneration associated with a variable degree of demyelinating features depending on the severity of the disease.

Although the current classification of the different forms of CMT disease, based on the mode of transmission and electrophysiological measurements, remains of some use in guiding molecular genetic analysis, it suffers from certain limitations since it uses different terms to designate the same *GDAP1*-associated CMT disorders.

#### Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of CMT disorders involving *GDAP1* mutations

##### Role of *GDAP1* in mitochondrial dynamics

Mitochondrial fusion and fission not only determine mitochondrial morphology and size, but also regulate mitochondrial distribu-

tion and function (Chan, 2006). A group of conserved large dynamin-related GTPases maintains the critical balance between mitochondrial fission and fusion.

Mitochondrial fusion requires outer as well as inner membrane components. This process is regulated by three GTPase proteins: mitofusin 1 (MFN1), mitofusin 2 (MFN2), and optic atrophy protein 1 (OPA1). MFN1 and MFN2 are mitochondrial transmembrane proteins localized in the outer membrane and appear to play similar roles in mitochondrial fusion. During mitochondrial fusion, through interactions of their coiled-coil domains, MFN1 and MFN2 may form homo-oligomeric and hetero-oligomeric complexes, thus tethering together the outer membranes of the neighboring mitochondria (Koshiba et al., 2004). GTPase OPA1 has been shown to be the main mediator of inner membrane fusion in mammals (Cipolat et al., 2004; Olichon et al., 2003).

Mitochondrial fission in mammals mainly involves the dynamin-related protein 1 (Drp1), also referred to as the dynamin-like protein 1 (DLP1), a member of the conserved dynamin-related large GTPase superfamily. This cytosolic protein is recruited on the external surface of the mitochondrial outer membrane by Fis1, which acts as a receptor to Drp1. Drp1 can also oligomerize and assemble into rings or spirals surrounding the mitochondrial outer membrane (Ingerman et al., 2005). GTP hydrolysis leads to the formation of a constriction initiating mitochondrial fission. The pathophysiology of *GDAP1* is not yet fully understood. It has been shown that *GDAP1* is a regulator of mitochondrial fission (Niemann et al., 2005) and that *GDAP1*-induced fission is dependent on fission factors Fis1 and Drp1 (Niemann et al., 2009). Overexpression of the dominant mutant forms of *GDAP1* (R120W, T157P, and Q218E) in COS7 cells leads to mitochondrial fragmentation comparable to the overexpression of wild-type *GDAP1*. The co-expression of MFN1 or MFN2 appears unable to counteract this effect, leading to the hypothesis that the overexpression of dominant mutant forms of *GDAP1* may impair the process of mitochondrial fusion. In recessive forms of the disease, the complete loss of the *GDAP1* function is associated with the truncated protein. Niemann et al. (2005) showed that the truncated proteins *GDAP1* T288fs290X and *GDAP1* S194X were not targeted efficiently to the mitochondria and found that *GDAP1* Q163X was not detectable suggesting that the Q163X mutation generates a highly unstable protein. No mitochondrial fragmentation-inducing activity was associated with these mutants showing that the carboxyl-terminal tail-anchor domain of the protein is required for the mitochondrial fission events. *GDAP1*, carrying the R161H, R310Q missense mutations, is correctly targeted to the mitochondria but the *GDAP1*-mediated fission activity is altered because of the more highly connected network (Pedrola et al., 2008; Niemann et al., 2005; Wagner et al., 2009).

The mitochondrial fission defect triggering axonal neuropathy remains to be identified. The alteration of mitochondrial fission and fusion processes significantly affects neuronal function. Neurons are particularly vulnerable to mitochondrial dysfunction because of their dependence on a high metabolic rate (Benard et al., 2007). Indeed, neurons are highly specialized cells which require large amounts of energy to maintain ionic transmission all through the axons and synapses. Specifically affected in CMT disease, motor neurons have axons up to one meter long. It has been demonstrated that mitochondrial migration along the axon plays a primary role in energy transport.

The importance of fission and fusion proteins in the biology of neurons is underscored by the occurrence of several neurodegenerative diseases that result from mutations in these genes. Mutations in *MFN2* cause the autosomal dominant disease CMT2A2, a peripheral neuropathy of motor and sensory neurons (Zuchner et al., 2004). Mutations in *OPA1* promote autosomal dominant optic atrophy (ADOA), a commonly inherited form of optic nerve degeneration (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000). A mutation in the fission gene *Drp1* has recently been identified in a newborn child with abnormal brain development and optic atrophy (Waterham et al., 2007). Mitochondrial dysfunction is also present in other rare inherited diseases and in common neurodegenerative diseases, including Huntington's disease, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis, stroke, and epilepsy (Lin and Beal, 2006; Su et al., 2010). Mitochondrial dysfunction may also play a role in psychiatric disorders, including bipolar disorders (Kato, 2006).

It has been suggested that an axonal transport defect may play an important role in *MFN2*-related CMT2A2. This hypothesis is reinforced by the observation of abnormal mitochondrial distribution in the Purkinje cells of *MFN2*-deficient mice (Chen et al., 2007). Moreover, it has been shown that the mitochondrial function in axons is significantly impaired in cultured dorsal root ganglion neurons expressing disease-mutated forms of *MFN2* (Baloh et al., 2007). In addition, the accumulation of mitochondria in the distal part of sural nerve axons has been observed in CMT2A2 patients (Vallat et al., 2008). This mitochondrial accumulation was also seen in *MFN2* mutant mouse (R94Q) named MitoCharc as a model of CMT2A, with a significant increase of mitochondrial density specifically in the distal axons that may be related to a defect in the retrograde transport of mitochondria, an increase in the total number of mitochondria or in the number of the fission events (Cartoni et al., 2010). A study provided evidence for a direct role for *MFN2* in mediating mitochondrial transport by interacting with the Miro/Milton complex which is linking the mitochondria to kinesin motors (Misko et al., 2010). These findings suggest that a mitochondrial transport defect is the main mechanism involved in the pathophysiology of the CMT2A2. Moreover, in other mitochondrial forms of CMT, previous studies have shown that disruption of assembly and aggregation of neurofilaments are the consequences of *HSPB1* mutations in CMT2F (Evgrafov et al., 2004; Ackerley et al., 2006) and *HSPB8* in CMT2L (Irobi et al., 2004), emphasizing the role of axonal transport as the main pathological mechanism in mitochondrial-related CMT diseases. Thus, a similar mechanism could be evoked in CMT disorders involving *GDAP1* mutations, with severe defects in mitochondrial dynamics or axonal transport dramatically affecting the peripheral nerves by depriving the distal axon of a needed source of energy.

#### *Defective mitochondrial bioenergetics associated with GDAP1 mutations*

Mitochondrial dynamics is closely related to bioenergetics and to the apoptotic process (Benard et al., 2007). The main functions of the mitochondria include production of cellular ATP, participation in the synthesis of key metabolites, and calcium buffering. The mitochondria, which are also the primary cellular source of endogenous reactive oxygen species (ROS), play an important role in the

regulation of apoptosis (Wallace et al., 2010). A sustained increase of the mitochondrial ROS load and decrease of the mitochondrial membrane potential lead to liberation of pro-apoptotic factors from the mitochondria inducing mitochondrial dependent apoptosis. The early stages of apoptosis include fragmentation of the mitochondrial network and remodeling of the cristae (Olichon et al., 2003).

Studies of *MFN2* and *OPA1* fusion proteins show that mitochondrial dynamics is essential to oxidative phosphorylation and ATP production. More precisely, the down-regulation of *MFN2* was shown to be correlated with decreased glucose oxidation and reduced mitochondrial membrane potential (Pich et al., 2005). Reduced mitochondrial membrane potential together with an energetic coupling defect was found in fibroblasts from CMT2A patients carrying *MFN2* mutations (Loiseau et al., 2007; Guillet et al., 2010). *OPA1* is also involved in mitochondrial bioenergetics as shown by the reduction of complex IV activity (Chevrollier et al., 2008). Moreover, growth in galactose medium of *OPA1* mutant fibroblasts forcing the cells to use oxidative phosphorylation, disrupted mitochondrial fusion and led to a significant reduction of complex I activity in mutant cells (Zanna et al., 2008). Interestingly enough, we have recently shown that *GDAP1* mutations in fibroblasts from CMT2K patients carrying the C240Y mutation are associated with mitochondrial complex I defect (Cassereau et al., 2009). Complex I, or NADH ubiquinone oxidoreductase, the first enzyme of the respiratory chain, which participates in the electron and proton transport necessary for ATP synthesis, is also a major site for ROS production. Complex I, which has been associated with several neurodegenerative diseases, is also the largest mitochondrial respiratory chain complex with 45 subunits and forms one of the entry points for electrons into the OXPHOS system. Mitochondrial DNA (mtDNA) encodes seven complex I subunits, the remaining subunits being encoded by nuclear genes. Mitochondrial complex I oxidizes NADH, produced predominantly by the tricarboxylic acid cycle and  $\beta$ -oxidation, to regenerate the NADH pool. Electrons released during the oxidation of NADH are transferred to a non-covalently bound flavin mononucleotide (FMN) and are subsequently passed through a series of iron-sulfur clusters (Fe-S) to reduce ubiquinone to ubiquinol. Each electron transfer is coupled to the pumping of four protons into the intermembrane space.

The association between complex I deficiency and *GDAP1* mutations suggests that *GDAP1* may play a protective role against oxidative stress. This hypothesis is based on the fact that *GDAP1* has structural domains related to the cytosolic GSTs; however, no experimental GST activity has been demonstrated so far. GSTs are widely distributed, present both in plants and animals, and play a role in the detoxification of xenobiotics and endogenous toxicants. The primary catalytic activity of GSTs is the conjugation of electrophilic compounds through nucleophilic attack by reduced glutathione (GSH). The faulty operation of this process would lead to increased ROS production (Fig. 3). Free radicals have been associated with deleterious effects on lipid peroxidation, and on protein oxidation of complex I (Ketterer et al., 1988; Zhao et al., 1999). Recently, dominantly inherited mutant forms of *GDAP1* have been shown to induce ROS production and trigger apoptosis (Niemann et al., 2009). This result supports the hypothesis that overproduction of ROS may contribute to the pathogenesis of CMT4A/2K. Moreover, it has been shown that ROS-induced signaling pathways are involved in controlling complex I function, in the formation of respiratory chain supercomplexes and phosphorylation and/or acetylation in both healthy and pathological conditions (Koopman et al., 2010). Overproduction of free radicals has a harmful effect on respiratory chain complex I by inducing protein oxidation leading to a reduction of enzymatic activities (Fridovich, 1997). This sets up a vicious circle in which complex I is not only the source but also the target of free radicals. Another consequence of the increase of free radicals is lipid peroxidation, which may affect mitochondrial function through alteration of the inner membrane, preventing it from playing its role

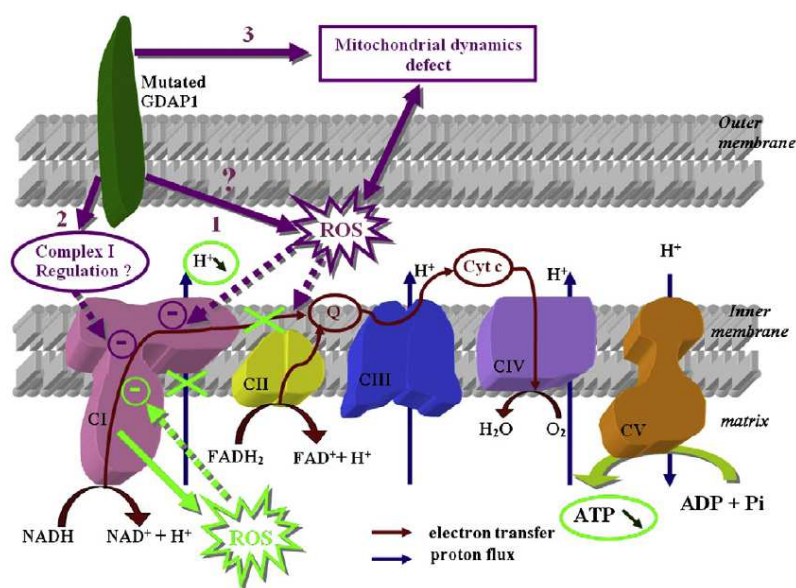


Fig. 3. Schematic hypotheses evoked to explain the mitochondrial dynamics and bioenergetics defect in CMT4A/2K (purple dotted arrows) and consequences of the complex I deficiency (in green). 1: The mutated GDAP1 increases the ROS level which has a deleterious effect on lipid peroxidation, and on protein oxidation of complex I. 2: GDAP1 plays a role in complex I regulation involving the phosphorylation and/or acetylation pathways. 3: The mutated GDAP1 is responsible for a mitochondrial dynamics defect, either directly or through an increase of the ROS level. A deficit of complex I leads to a decrease in the reduction of NADH, altered electron transfer to complex III, a reduction of the pumping of protons into the intermembrane space, an excessive production of ROS and, finally, a reduction of ATP synthesis.

in the barrier function (Chen et al., 1995). Free radicals may also contribute to pathogenicity by promoting neuronal apoptosis. Indeed, it has been demonstrated that enhanced ROS levels increase cytochrome-*c* release during apoptotic stimuli, which in turn promote the opening of mitochondrial permeability transition pore (Porcelli et al., 2009).

Complex I deficiency, the most common enzymatic deficiency of the OXPHOS system (Smeitink and van den Heuvel, 1999; Triepels et al., 2001), is associated with a large spectrum of diseases from the Leigh syndrome, Leber's hereditary optic neuropathy, mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS syndrome) to the pathogenesis of many devastating neurodegenerative disorders, including Parkinson's disease (PD) (Schapira et al., 1990). The clinical aspects of PD include bradykinesia, rigidity, and tremor associated with the death of dopaminergic neurons in the substantia nigra. The analysis of mitochondrial OXPHOS enzymes in the brain, blood and muscle cells of PD patients have revealed complex I deficiencies (Schapira et al., 1989; Bindoff et al., 1989). In rats, chronic exposure to rotenone has been shown to induce the neuropathological and behavioral features seen in PD (Greenamyre et al., 2001; Caboni et al., 2004). The experimental induction of PD in rats was also associated with complex I overproduction of ROS, which was successfully blocked by antioxidant treatment with vitamin E (Testa et al., 2005). Furthermore, mitochondrial dynamics has been shown to be impaired in PD (Van Laar and Berman, 2009). These findings suggest that the various forms of CMT disease involving *GDAP1* mutations described here may share pathophysiological similarities with PD.

Complex I deficiency leads to reduced NADH oxidation and decreased electron transfer, causing a sharp reduction of ATP synthesis. Mitochondrial dynamics is ATP-dependent (Legros et al., 2002); thus, the lack of ATP could reduce mitochondrial mobility, particularly in the distal portion of neuronal axons. Insufficient mitochondrial

motility in the long axons might explain, at least in part, why the distal portions of the peripheral nerves are principally affected in CMT disease involving *GDAP1* mutations.

## Conclusion

The examination of the relationship between the genotype and the phenotype of the various forms of CMT disease involving *GDAP1* mutations shows that the recessive forms are generally far more severe than the dominant form. In particular, in the recessive forms, the truncating mutations have a more severe phenotype, with early onset and rapid progression of the disease leading to the inability to walk by the age of 10, generally followed by wheelchair dependence before the end of the third decade. These peripheral neuropathies appear to be mainly axonal, involving a variable degree of demyelination depending on the severity of the disease. The analysis of a larger number of cases of CMT disease involving *GDAP1* mutations, along with detailed clinical, electrophysiological and pathological data, should yield an explanation for the intra- and inter-familial variability observed. *GDAP1* mutations seem to be mainly targeted at the alteration of mitochondria; however, the precise pathophysiological mechanisms involved remain to be elucidated. Animal models with *GDAP1* mutations should offer further information and allow the testing of potential therapeutics for the various forms of CMT disease related to these gene mutations.

## Acknowledgments

We are grateful to Kanaya Malkani for the critical reading of the manuscript. This research was supported in part by grants from the University Hospital of Angers, the University of Angers, and the Association contre les Maladies Mitochondriales (AMMi).

## References

- Ackerley, S., James, P.A., Kalli, A., French, S., Davies, K.E., Talbot, K., 2006. A mutation in the small heat-shock protein HSPB1 leading to distal hereditary motor neuropathy disrupts neurofilament assembly and the axonal transport of specific cellular cargoes. *Hum. Mol. Genet.* 15, 347–354.
- Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auberger, G., Bhattacharya, S.S., Wissinger, B., 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.* 26, 211–215.
- American Academy of Neurology, 1991. Research criteria for diagnosis of chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIPD). *Neurology* 41, 617–618.
- Ammar, N., Nelis, E., Merlini, L., Barisic, N., Amouri, R., Ceuterick, C., Martin, J.J., Timmerman, V., Hentati, F., De Jonghe, P., 2003. Identification of novel GDAP1 mutations causing autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromuscul. Disord.* 13, 720–728.
- Auer-Grumbach, M., Fischer, C., Papic, L., John, E., Plecko, B., Bittner, R.E., Bernert, G., Pieber, T.R., Miltenberger, G., Schwarz, R., Windpassinger, C., Grill, F., Timmerman, V., Speicher, M.R., Janecke, A.R., 2008. Two novel mutations in the GDAP1 and PRX genes in early onset Charcot-Marie-Tooth syndrome. *Neuropediatrics* 39, 33–38.
- Azzedine, H., Ruberg, M., Ente, D., Gilardeau, C., Perie, S., Wechsler, B., Brice, A., LeGuern, E., Dubourg, O., 2003. Variability of disease progression in a family with autosomal recessive CMT associated with a S194X and new R310Q mutation in the GDAP1 gene. *Neuromuscul. Disord.* 13, 341–346.
- Baloh, R.H., Schmidt, R.E., Pestronk, A., Milbrandt, J., 2007. Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J. Neurosci.* 27, 422–430.
- Banchs, I., Casasnovas, C., Alberti, A., De Jorge, L., Povedano, M., Montero, J., Martínez-Matos, J.A., Volpini, V., 2009. Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009, 985415.
- Barankova, L., Vyhnavkova, E., Zuchner, S., Mazanec, R., Sakmarova, I., Vondracek, P., Merlini, L., Bojar, M., Nelis, E., De Jonghe, P., Seeman, P., 2007. GDAP1 mutations in Czech families with early-onset CMT. *Neuromuscul. Disord.* 17, 482–489.
- Baxter, R.V., Ben Othmane, K., Rochelle, J.M., Stajich, J.E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Ben Hamida, M., Bel, S., Stenger, J.E., Gilbert, J.R., Pericak-Vance, M.A., Vance, J.M., 2002. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat. Genet.* 30, 21–22.
- Ben Othmane, K., Hentati, F., Lemmon, F., Ben Hamida, C., Blel, S., Roses, A.D., Pericak-Vance, M.A., Ben Hamida, M., Vance, J.M., 1993. Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q. *Hum. Mol. Genet.* 2, 1625–1628.
- Benard, G., Bellance, N., James, D., Parrone, P., Fernandez, H., Letellier, T., Rossignol, R., 2007. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J. Cell Sci.* 120, 838–848.
- Biancheri, R., Zara, F., Striano, P., Pedemonte, M., Cassandrini, D., Stringara, S., Manganelli, F., Santoro, L., Schenone, A., Bellone, E., Minetti, C., 2006. GDAP1 mutation in autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth with pyramidal features. *J. Neurol.* 253, 1234–1235.
- Bindoff, L.A., Birch-Machin, M., Cartlidge, N.E., Parker Jr., W.D., Turnbull, D.M., 1989. Mitochondrial function in Parkinson's disease. *Lancet* 2, 49.
- Birouk, N., Gouider, R., Le Guern, E., Gugenheim, M., Tardieu, S., Maisonobe, T., Le Forestier, N., Agid, Y., Brice, A., Bouche, P., 1997. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain* 120 (Pt 5), 813–823.
- Birouk, N., Azzedine, H., Dubourg, O., Muriel, M.P., Benomar, A., Hamadouche, T., Maisonobe, T., Ouazzani, R., Brice, A., Yahyaoui, M., Chkili, T., Le Guern, E., 2003. Phenotypical features of a Moroccan family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease associated with the S194X mutation in the GDAP1 gene. *Arch. Neurol.* 60, 598–604.
- Boerkoel, C.F., Takashima, H., Nakagawa, M., Izumo, S., Armstrong, D., Butler, I., Mancias, P., Pappasozomenos, S.C., Stern, L.Z., Lupski, J.R., 2003. CMT4A: identification of a Hispanic GDAP1 founder mutation. *Ann. Neurol.* 53, 400–405.
- Bouhouche, A., Birouk, N., Azzedine, H., Benomar, A., Durosier, G., Ente, D., Muriel, M.P., Ruberg, M., Slassi, I., Yahyaoui, M., Dubourg, O., Ouazzani, R., LeGuern, E., 2007a. Autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease (ARCMT2): phenotype-genotype correlations in 13 Moroccan families. *Brain* 130, 1062–1075.
- Bouhouche, A., Birouk, N., Benomar, A., Ouazzani, R., Chkili, T., Yahyaoui, M., 2007b. A novel GDAP1 mutation P78L responsible for CMT4A disease in three Moroccan families. *Can. J. Neurol. Sci.* 34, 421–426.
- Caboni, P., Sherer, T.B., Zhang, N., Taylor, G., Na, H.M., Greenamyre, J.T., Casida, J.E., 2004. Rotenone, deguelin, their metabolites, and the rat model of Parkinson's disease. *Chem. Res. Toxicol.* 17, 1540–1548.
- Cartoni, R., Martinou, J.C., 2009. Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp. Neurol.* 218, 268–273.
- Cartoni, R., Arnaud, E., Medard, J.J., Poirot, O., Courvoisier, D.S., Chrast, R., Martinou, J.C., 2010. Expression of mitofusin 2 (R94Q) in a transgenic mouse leads to Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Brain* 133, 1460–1469.
- Cassereau, J., Chevrollier, A., Gueguen, N., Malinge, M.C., Letourmel, F., Nicolas, G., Richard, L., Ferre, M., Verny, C., Dubas, F., Procaccio, V., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Reynier, P., 2009. Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics* 10, 145–150.
- Chan, D.C., 2006. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 22, 79–99.
- Chen, J.J., Bertrand, H., Yu, B.P., 1995. Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products. *Free Radic. Biol. Med.* 19, 583–590.
- Chen, H., McCaffery, J.M., Chan, D.C., 2007. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130, 548–562.
- Chevrollier, A., Guillet, V., Loiseau, D., Gueguen, N., de Crescenzo, M.A., Verny, C., Ferre, M., Dollfus, H., Odent, S., Milea, D., Goizet, C., Amati-Bonneau, P., Procaccio, V., Bonneau, D., Reynier, P., 2008. Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann. Neurol.* 63, 794–798.
- Chung, K.W., Kim, S.M., Sunwoo, I.N., Cho, S.Y., Hwang, S.J., Kim, J., Kang, S.H., Park, K.D., Choi, K.G., Choi, I.S., Choi, B.O., 2008. A novel GDAP1 Q218E mutation in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Hum. Genet.* 53, 360–364.
- Cipolat, S., Martins de Brito, O., Dal Zilio, B., Scorrano, L., 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 15927–15932.
- Claramunt, R., Pedrola, L., Sevilla, T., Lopez de Munain, A., Berciano, J., Cuesta, A., Sanchez-Navarro, B., Millan, J.M., Saifi, G.M., Lupski, J.R., Vilchez, J.J., Espinos, C., Palau, F., 2005. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J. Med. Genet.* 42, 358–365.
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., Garcia-Planells, J., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marin, I., Vilchez, J.J., Palau, F., 2002. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat. Genet.* 30, 22–25.
- De Sandre-Giovannoli, A., Chaouch, M., Boccaccio, I., Bernard, R., Delague, V., Grid, D., Vallat, J.M., Levy, N., Megarbane, A., 2003. Phenotypic and genetic exploration of severe demyelinating and secondary axonal neuropathies resulting from GDAP1 nonsense and splicing mutations. *J. Med. Genet.* 40, e87.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffon, J.M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E., Astarie-Dequer, C., Lasquellec, L., Arnaud, B., Ducommun, B., Kaplan, J., Hamel, C.P., 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* 26, 207–210.
- den Dunnen, J.T., Antonarakis, S.E., 2000. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum. Mutat.* 15, 7–12.
- den Dunnen, J.T., Paalman, M.H., 2003. Standardizing mutation nomenclature: why bother? *Hum. Mutat.* 22, 181–182.
- Di Maria, E., Gulli, R., Balestra, P., Cassandrini, D., Pigullo, S., Doria-Lamba, L., Bado, M., Schenone, A., Ajmar, F., Mandich, P., Bellone, E., 2004. A novel mutation of GDAP1 associated with Charcot-Marie-Tooth disease in three Italian families: evidence for a founder effect. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 75, 1495–1498.
- Dubourg, O., Azzedine, H., Verny, C., Durosier, G., Birouk, N., Gouider, R., Salih, M., Bouhouche, A., Thiam, A., Grid, D., Mayer, M., Ruberg, M., Tazir, M., Brice, A., LeGuern, E., 2006. Autosomal-recessive forms of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med.* 8, 75–86.
- Emery, A.E., 1991. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases—a world survey. *Neuromuscul. Disord.* 1, 19–29.
- Evgrafov, O.V., Mersyanova, I., Irobi, J., Van Den Bosch, L., Dierick, I., Leung, C.L., Schagina, O., Verpoorten, N., Van Impe, K., Fedotov, V., Dadali, E., Auer-Grumbach, M., Windpassinger, C., Wagner, K., Mitrovic, Z., Hilton-Jones, D., Talbot, K., Martin, J.J., Vasserman, N., Tverskaya, S., Polyakov, A., Liem, R.K., Gettemans, J., Robberecht, W., De Jonghe, P., Timmerman, V., 2004. Mutant small heat-shock protein 27 causes axonal Charcot-Marie-Tooth disease and distal hereditary motor neuropathy. *Nat. Genet.* 36, 602–606.
- Fridovich, I., 1997. Superoxide anion radical (O<sup>2•-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J. Biol. Chem.* 272, 18515–18517.
- Georgiou, D.M., Nicolaou, P., Chitayat, D., Koutsou, P., Babul-Hirji, R., Vajsar, J., Murphy, J., Christodoulou, K., 2006. A novel GDAP1 mutation 439delA is associated with autosomal recessive CMT disease. *Can. J. Neurol. Sci.* 33, 311–316.
- Greenamyre, J.T., Sherer, T.B., Betarbet, R., Panov, A.V., 2001. Complex I and Parkinson's disease. *IUBMB Life* 52, 135–141.
- Guillet, V., Gueguen, N., Verny, C., Ferre, M., Homedan, C., Loiseau, D., Procaccio, V., Amati-Bonneau, P., Bonneau, D., Reynier, P., Chevrollier, A., 2010. Adenine nucleotide translocase is involved in a mitochondrial coupling defect in MFN2-related Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Neurogenetics* 11, 127–133.
- Hattori, N., Yamamoto, M., Yoshihara, T., Koike, H., Nakagawa, M., Yoshikawa, H., Ohnishi, A., Hayasaka, K., Onodera, O., Baba, M., Yasuda, H., Saito, T., Nakashima, K., Kira, J., Kaji, R., Oka, N., Sobue, G., 2003. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. *Brain* 126, 134–151.
- Ingerman, E., Perkins, E.M., Marino, M., Mears, J.A., McCaffery, J.M., Hinshaw, J.E., Nunnari, J., 2005. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J. Cell Biol.* 170, 1021–1027.
- Irobi, J., Van Impe, K., Seeman, P., Jordanova, A., Dierick, I., Verpoorten, N., Michalik, A., De Vriendt, E., Jacobs, A., Van Gerwen, V., Vennekens, K., Mazanec, R., Tournev, I., Hilton-Jones, D., Talbot, K., Kremensky, I., Van Den Bosch, L., Robberecht, W., Van Vandeckerckhove, J., Van Broeckhoven, C., Gettemans, J., De Jonghe, P., Timmerman, V., 2004. Hot-spot residue in small heat-shock protein 22 causes distal motor neuropathy. *Nat. Genet.* 36, 597–601.
- Kabzinska, D., Kochanski, A., Drac, H., Ryniewicz, B., Rowinska-Marcinska, K., Hausmanowa-Petrusewicz, I., 2005. Autosomal recessive axonal form of Charcot-Marie-Tooth disease caused by compound heterozygous 3'-splice site and Ser130Cys mutation in the GDAP1 gene. *Neuropediatrics* 36, 206–209.
- Kabzinska, D., Kochanski, A., Drac, H., Rowinska-Marcinska, K., Ryniewicz, B., Pedrola, L., Palau, F., Hausmanowa-Petrusewicz, I., 2006a. A novel Met116Thr mutation in the GDAP1 gene in a Polish family with the axonal recessive Charcot-Marie-Tooth type 4 disease. *J. Neurol. Sci.* 241, 7–11.
- Kabzinska, D., Drac, H., Rowinska-Marcinska, K., Fidzianska, A., Kochanski, A., Hausmanowa-Petrusewicz, I., 2006b. Early onset Charcot-Marie-Tooth disease caused by a homozygous Leu239Phe mutation in the GDAP1 gene. *Acta Myol.* 25, 34–37.



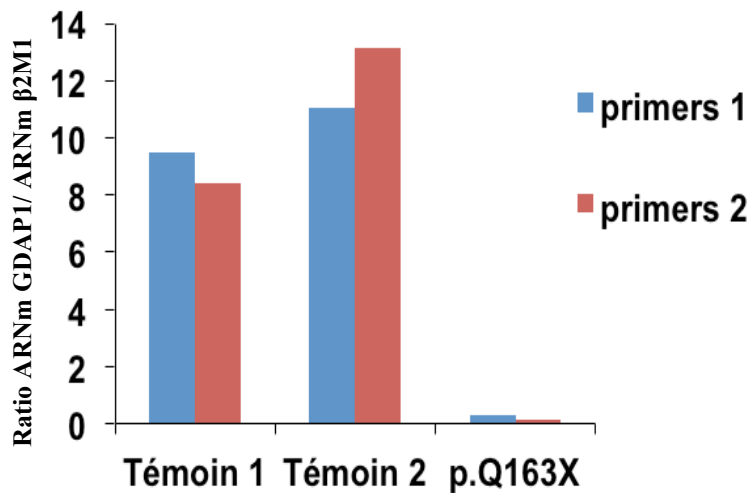
- Kabzinska, D., Saifi, G.M., Drac, H., Rowinska-Marcinska, K., Hausmanowa-Petruzewicz, I., Kochanski, A., Lupski, J.R., 2007. Charcot-Marie-Tooth disease type 4C caused by a novel Pro153Leu substitution in the GDAP1 gene. *Acta Myol.* 26, 108–111.
- Kabzinska, D., Strugalska-Cynowska, H., Kostera-Pruszczyk, A., Ryniewicz, B., Posmyk, R., Midro, A., Seeman, P., Barankova, L., Zimon, M., Baets, J., Timmerman, V., Guergueltcheva, V., Tournev, I., Sarafov, S., De Jonghe, P., Jordanova, A., Hausmanowa-Petruzewicz, I., Kochanski, A., 2010. L239F founder mutation in GDAP1 is associated with a mild Charcot-Marie-Tooth type 4C (CMT4C) phenotype. *Neurogenetics*.
- Kato, T., 2006. The role of mitochondrial dysfunction in bipolar disorder. *Drug News Perspect.* 19, 597–602.
- Ketterer, B., Meyer, D.J., Tan, K.H., 1988. The role of glutathione transferase in the detoxication and repair of lipid and DNA hydroperoxides. *Basic Life Sci.* 49, 669–674.
- Koopman, W.J., Nijtmans, L.G., Dieteren, C.E., Roestenberg, P., Valsecchi, F., Smeitink, J.A., Willems, P.H., 2010. Mammalian mitochondrial complex I: biogenesis, regulation, and reactive oxygen species generation. *Antioxid. Redox Signal.* 12, 1431–1470.
- Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., Chan, D.C., 2004. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusins complexes. *Science* 305, 858–862.
- Legros, F., Lombes, A., Frachon, P., 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.
- Lewis, R.A., Sumner, A.J., Shy, M.E., 2000. Electrophysiological features of inherited demyelinating neuropathies: a reappraisal in the era of molecular diagnosis. *Muscle Nerve* 23, 1472–1487.
- Lin, M.T., Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 443, 787–795.
- Liu, H., Nakagawa, T., Kanematsu, T., Uchida, T., Tsuji, S., 1999. Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *J. Neurochem.* 72, 1781–1790.
- Loiseau, D., Chevrollier, A., Verny, C., Guillet, V., Gueguen, N., Pou de Crescenzo, M.A., Ferre, M., Malinge, M.C., Guichet, A., Nicolas, G., Amati-Bonneau, P., Malthiery, Y., Bonneau, D., Reynier, P., 2007. Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann. Neurol.* 61, 315–323.
- Marco, A., Cuesta, A., Pedrola, L., Palau, F., Marin, I., 2004. Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol. Biol. Evol.* 21, 176–187.
- Misko, A., Jiang, S., Wegorzewska, I., Milbrandt, J., Baloh, R.H., 2010. Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J. Neurosci.* 30, 4232–4240.
- Moroni, I., Morbin, M., Milani, M., Ciano, C., Bugiani, M., Pagliano, E., Cavallaro, T., Pareyson, D., Taroni, F., 2009. Novel mutations in the GDAP1 gene in patients affected with early-onset axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A. *Neuromuscul. Disord.* 19, 476–480.
- Nelis, E., Erdem, S., Van Den Bergh, P.Y., Belpaire-Dethiou, M.C., Ceuterick, C., Van Gerwen, V., Cuesta, A., Pedrola, L., Palau, F., Gabreels-Festen, A.A., Verellen, C., Tan, E., Demirci, M., Van Broeckhoven, C., De Jonghe, P., Topaloglu, H., Timmerman, V., 2002. Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology* 59, 1865–1872.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A., Suter, U., 2005. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Cell Biol.* 170, 1067–1078.
- Niemann, A., Wagner, K.M., Ruegg, M., Suter, U., 2009. GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol. Dis.* 36, 509–520.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P., Lenaers, G., 2003. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 7743–7746.
- Parman, Y., Battaloglu, E., Baris, I., Bilir, B., Poyraz, M., Bissar-Tadmouri, N., Williams, A., Ammar, N., Nelis, E., Timmerman, V., De Jonghe, P., Najafov, A., Deymeer, F., Serdaroglu, P., Brophy, P.J., Said, G., 2004. Clinicopathological and genetic study of early-onset demyelinating neuropathy. *Brain* 127, 2540–2550.
- Pedrola, L., Espert, A., Wu, X., Claramunt, R., Shy, M.E., Palau, F., 2005. GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1087–1094.
- Pedrola, L., Espert, A., Valdes-Sanchez, T., Sanchez-Piris, M., Sirkowski, E.E., Scherer, S.S., Farinas, I., Palau, F., 2008. Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J. Cell. Mol. Med.* 12, 679–689.
- Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacin, M., Zorzano, A., 2005. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum. Mol. Genet.* 14, 1405–1415.
- Porcellini, A.M., Angelin, A., Ghelli, A., Mariani, E., Martinuzzi, A., Carelli, V., Petronilli, V., Bernardi, P., Rugolo, M., 2009. Respiratory complex I dysfunction due to mitochondrial DNA mutations shifts the voltage threshold for opening of the permeability transition pore toward resting levels. *J. Biol. Chem.* 284, 2045–2052.
- Ratajowski, M., Pulaski, L., 2009. YY1-dependent transcriptional regulation of the human GDAP1 gene. *Genomics* 94, 407–413.
- Rougeot, C., Chabrier, S., Camdesanche, J.P., Prieur, F., d'Anjou, M.C., Latour, P., 2008. Clinical, electrophysiological and genetic studies of two families with mutations in the GDAP1 gene. *Neuropediatrics* 39, 184–187.
- Sahin-Calapoglu, N., Tan, M., Soyoz, M., Calapoglu, M., Ozelik, N., 2009. Novel GDAP1 mutation in a Turkish family with CMT2K (CMT2K with novel GDAP1 mutation). *Neuromolecular Med.* 11, 106–113.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Jenner, P., Clark, J.B., Marsden, C.D., 1989. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1, 1269.
- Schapira, A.H., Cooper, J.M., Dexter, D., Clark, J.B., Jenner, P., Marsden, C.D., 1990. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J. Neurochem.* 54, 823–827.
- Senderek, J., Bergmann, C., Ramaekers, V.T., Nelis, E., Bernert, G., Makowski, A., Zuchner, S., De Jonghe, P., Rudnik-Schoneborn, S., Zerres, K., Schroder, J.M., 2003. Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain* 126, 642–649.
- Sevilla, T., Cuesta, A., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., Pedrola, L., Palau, F., Vilchez, J.J., 2003. Clinical, electrophysiological and morphological findings of Charcot-Marie-Tooth neuropathy with vocal cord palsy and mutations in the GDAP1 gene. *Brain* 126, 2023–2033.
- Sevilla, T., Jaijo, T., Nauffal, D., Collado, D., Chumillas, M.J., Vilchez, J.J., Muelas, N., Bataller, L., Domenech, R., Espinos, C., Palau, F., 2008. Vocal cord paresis and diaphragmatic dysfunction are severe and frequent symptoms of GDAP1-associated neuropathy. *Brain* 131, 3051–3061.
- Shield, A.J., Murray, T.P., Board, P.G., 2006. Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 347, 859–866.
- Smeitink, J., van den Heuvel, L., 1999. Human mitochondrial complex I in health and disease. *Am. J. Hum. Genet.* 64, 1505–1510.
- Stojkovic, T., Latour, P., Viet, G., de Seze, J., Hurtevent, J.F., Vandenberghe, A., Vermersch, P., 2004. Vocal cord and diaphragm paralysis, as clinical features of a French family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease, associated with a new mutation in the GDAP1 gene. *Neuromuscul. Disord.* 14, 261–264.
- Su, B., Wang, X., Zheng, L., Perry, G., Smith, M.A., Zhu, X., 2010. Abnormal mitochondrial dynamics and neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 135–142.
- Testa, C.M., Sherer, T.B., Greenamyre, J.T., 2005. Rotenone induces oxidative stress and dopaminergic neuron damage in organotypic substantia nigra cultures. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 134, 109–118.
- Triepels, R.H., Van Den Heuvel, L.P., Trijbels, J.M., Smeitink, J.A., 2001. Respiratory chain complex I deficiency. *Am. J. Med. Genet.* 106, 37–45.
- Vallat, J.M., Ouvrier, R.A., Pollard, J.D., Magdelaine, C., Zhu, D., Nicholson, G.A., Grew, S., Ryan, M.M., Funalot, B., 2008. Histopathological findings in hereditary motor and sensory neuropathy of axonal type with onset in early childhood associated with mitofusin 2 mutations. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 1097–1102.
- Van Laar, V.S., Berman, S.B., 2009. Mitochondrial dynamics in Parkinson's disease. *Exp. Neurol.* 218, 247–256.
- Wagner, K.M., Ruegg, M., Niemann, A., Suter, U., 2009. Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PLoS ONE* 4, e5160.
- Wallace, D.C., Fan, W., Procaccio, V., 2010. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 297–348.
- Waterham, H.R., Koster, J., van Roermund, C.W., Mooyer, P.A., Wanders, R.J., Leonard, J.V., 2007. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N. Engl. J. Med.* 356, 1736–1741.
- Xin, B., Puffenberger, E., Nye, L., Wiznitzer, M., Wang, H., 2008. A novel mutation in the GDAP1 gene is associated with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease in an Amish family. *Clin. Genet.* 74, 274–278.
- Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P.G., Gorman, G.S., Lourenco, C.M., Wright, A.F., Auer-Grumbach, M., Toscano, A., Musumeci, O., Valentino, M.L., Caporali, L., Lamperti, C., Tallaksen, C.M., Duffey, P., Miller, J., Whittaker, R.G., Baker, M.R., Jackson, M.J., Clarke, M.P., Dhillon, B., Czermin, B., Stewart, J.D., Hudson, G., Reynier, P., Bonneau, D., Marques Jr., W., Lenaers, G., McFarland, R., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Votruba, M., Zeviani, M., Carelli, V., Bindoff, L.A., Horvath, R., Amati-Bonneau, P., Chinnery, P.F., 2010. Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. *Brain* 133, 771–786.
- Zanna, C., Ghelli, A., Porcellini, A.M., Karbowski, M., Youle, R.J., Schimpf, S., Wissinger, B., Pinti, M., Cossarizza, A., Vidoni, S., Valentino, M.L., Rugolo, M., Carelli, V., 2008. OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 131, 352–367.
- Zhao, T., Singhal, S.S., Piper, J.T., Cheng, J., Pandya, U., Clark-Wronski, J., Awasthi, S., Awasthi, Y.C., 1999. The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Arch. Biochem. Biophys.* 367, 216–224.
- Zuchner, S., Mersiyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., Parman, Y., Egrafov, O., Jonghe, P.D., Takahashi, Y., Tsuji, S., Pericak-Vance, M.A., Quattrone, A., Battaloglu, E., Polyakov, A.V., Timmerman, V., Schroder, J.M., Vance, J.M., 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* 36, 449–451.
- Zuchner, S., De Jonghe, P., Jordanova, A., Claeys, K.G., Guergueltcheva, V., Cherninkova, S., Hamilton, S.R., Van Stavern, G., Krajewski, K.M., Stajich, J., Tournev, I., Verhoeven, K., Langerhorst, C.T., de Visser, M., Baas, F., Bird, T., Timmerman, V., Shy, M., Vance, J.M., 2006. Axonal neuropathy with optic atrophy is caused by mutations in mitofusin 2. *Ann. Neurol.* 59, 276–281.

## II.3. Résultats et discussion

Dans cet article de revue, nous avons tout d'abord rapporté toutes les mutations de *GDAP1* décrites à ce jour associées à leur phénotype clinique afin d'établir une corrélation génotype-phénotype, et nous avons étudié les paramètres électrophysiologiques et les données histologiques des patients pour tenter de caractériser la lésion primitive neuronale. La seconde partie de cet article est une discussion sur les différentes hypothèses physiopathologiques évoquées permettant d'expliquer la dysfonction bioénergétique mitochondriale mise en évidence dans les cellules porteuses de mutations dans *GDAP1*.

### - Présentation clinique

Bien qu'il existe une grande hétérogénéité clinique inter et intrafamiliale, nous avons pu montrer que les formes récessives étaient beaucoup plus sévères que les formes dominantes et que parmi les formes récessives, les patients atteints de mutations tronquantes avaient un phénotype plus sévère que les patients porteurs de mutations faux-sens. En effet, en cas de mutations tronquantes, tous les patients deviennent dépendants d'une aide technique pour la marche après l'âge de 10 ans et sont généralement dépendants du fauteuil roulant avant 35 ans alors que les patients porteurs de mutations faux-sens peuvent encore être indépendants pour la marche jusqu'à la fin de la quatrième décennie. C'est également dans le groupe des patients avec mutations tronquantes que les paralysies des cordes vocales et diaphragmatiques sont les plus fréquentes, généralement au cours de la deuxième décennie. Ces mutations tronquantes sont donc très probablement responsables d'une perte de fonction totale de la protéine alors que les mutations faux-sens semblent être responsables soit d'une diminution de la fonction en cas de forme récessive, soit d'un effet dominant négatif en cas de forme dominante. Cette hypothèse est renforcée par les résultats de PCR quantitative réalisée chez un patient porteur d'une mutation tronquante homozygote p.Q163X mettant en évidence une quasi absence d'ARNm de *GDAP1* (Figure 11). Ceci suggère une instabilité et une dégradation de l'ARNm en cas de mutation tronquante et donc l'absence de protéine. Ce résultat est conforté par une étude montrant que les protéines tronquées sont soit non adressées à la mitochondrie mais toujours détectables en immunohistochimie (p.T288fs290X, p.S194X), soit rapidement dégradées (p.Q163X) (Niemann et al., 2005).



**Figure 11: qPCR de GDAP1.**

La qPCR a été réalisée avec deux sets de primers différents chez le patient porteur de la mutation tronquante p.Q163X mettant en évidence une importante diminution de la quantité d'ARNm de GDAP1 rapportée à la beta-2-microglobuline ( $\beta$ 2M1).

- Le CMT4A/2K : une pathologie primitivement axonale

A ce jour, plus de 40 mutations ont été décrites responsables de formes axonales ou démyélinisantes sur la base des résultats électrophysiologiques et histologiques. Les formes axonales sont plus fréquentes que les formes décrites comme démyélinisantes, et ces formes démyélinisantes ont des caractéristiques différentes des autres formes de CMT démyélinisants. En effet, les VCM sont moins effondrées et les amplitudes des potentiels moteurs sont beaucoup plus faibles que celles obtenues chez les patients atteints de CMT démyélinisants (CMT1 et autres CMT4). En effet, dans ces formes de CMT, les patients ont des VCM effondrées (souvent inférieurs à 25m/s) avant l'âge de 2 ans et restent stables ensuite, alors que les amplitudes des potentiels moteurs sont encore conservées et diminuent progressivement dans les années qui suivent. Dans les formes décrites comme démyélinisantes liées à GDAP1, tous les patients ayant des VCM basses ont aussi des amplitudes effondrées, ce qui montre bien que, dans ces formes, il n'existe pas de démyélinisation primitive. Sur le plan anatomopathologique, on retrouve de façon quasi constante une perte des fibres de gros calibre ce qui peut être une cause des ralentissements des VCM. Bien qu'il semble exister des formes avec des éléments de démyélinisation comme en attestent les clusters de régénération et les aspects en « bulbes d'oignons » rapportés dans

certaines publications, il semble bien que le CMT lié aux mutations de GDAP1 soit une pathologie axonale avec un certain degré de démyélinisation suivant le stade d'évolution et la sévérité de la maladie des patients.

L'implication de la cellule de Schwann dans la démyélinisation observée parfois chez les patients CMT4A reste à étudier. Ces cellules interagissent avec le neurone, participent à son activité de transmission de l'influx nerveux et synthétisent la myéline qui entoure l'axone. Il semble par ailleurs que ces cellules jouent un rôle majeur dans l'apport de substrats énergétiques le long de l'axone. Dans le CMT4A/2K, l'hypothèse en cours est que l'atteinte axonale conduit à l'altération de la gaine de myéline et non l'inverse.

A partir de ganglions rachidiens dorsaux (DRG) de souris ou de rats, il est possible de cultiver des neurones et de co-cultiver des cellules de Schwann. L'inhibition de l'expression de GDAP1 par siRNA dans l'une ou l'autre des cellules devrait fournir des informations importantes sur la spécificité cellulaire de l'altération. Le développement de modèles murins GDAP1+/muté ou GDAP1muté/muté tissus spécifiques pourrait également permettre des analyses électrophysiologiques et anatomopathologiques afin de caractériser la lésion primitive du nerf.

La classification actuelle des CMT basée sur le mode de transmission et les vitesses de conduction est très utile pour orienter le diagnostic moléculaire dans la plupart des CMT, mais elle comporte des limites que le clinicien doit avoir à l'esprit. C'est le cas du CMT4A classé dans les CMT démyélinisants en raison de VCM parfois diminuées bien qu'il s'agisse d'une pathologie primitivement axonale.

#### - Hypothèses physiopathologiques de la dysfonction mitochondriale dans le CMT impliquant GDAP1

Dans les fibroblastes de patients porteurs de mutations de GDAP1 nous avons mis en évidence un déficit de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire. La diminution de la réduction du NADH par le complexe I diminue le transfert des électrons vers le complexe III et le pompage des protons vers l'espace intermembranaire. Ceci a pour conséquence une diminution de la production d'ATP que nous avons retrouvée chez tous ces patients. Un tel déficit en synthèse d'ATP a de nombreuses répercussions sur le tissu nerveux qui est un tissu ayant une forte demande en ATP mitochondrial. La baisse de la capacité de synthèse en ATP a une incidence sur la croissance et la survie de la cellule neuronale mais également sur son

activité métabolique. Ainsi, cette diminution de synthèse d'ATP altère la transmission de l'influx nerveux et la transmission synaptique (Jonas, 2006).

Nous pouvons proposer trois hypothèses afin d'expliquer le dysfonctionnement mitochondrial observé chez ces patients porteurs de mutations dans le gène *GDAP1*.

La première hypothèse est la perte de la fonction antioxydante de la protéine GDAP1 comme nous l'avons mentionnée dans la discussion du premier article. Les radicaux libres, provenant de la production endogène basale, seraient non éliminés et pourraient ainsi avoir une action néfaste sur la peroxydation lipidique, sur l'expression protéique et sur le complexe I directement par oxydation protéique (Ketterer et al., 1988; Zhao et al., 1999). Cela aboutirait à un déficit fonctionnel du complexe I. De plus, une mauvaise fonction enzymatique du complexe I peut conduire à la production en excès de radicaux libres. Des anomalies de ce type ont en effet été montrées dans des études sur fibroblastes porteurs de mutations dans les gènes codant pour des sous-unités nucléaires du complexe I (Koopman et al., 2007) ou dans des modèles de déficit du complexe I par l'utilisation de roténone dans des lignées de cellules leucémiques HL-60 (Li et al., 2003).

La seconde hypothèse est l'implication de GDAP1 dans la régulation du complexe I impliquant les voies de phosphorylation et acétylation. En effet, un défaut de phosphorylation peut être responsable d'un déficit d'activité de ce complexe. Il a par exemple été montré que la sous-unité NDUFS4 du complexe I pouvait être activée par phosphorylation par la protéine kinase A (PKA) et désactivée par déphosphorylation par une phosphatase calcium-dépendante (Papa, 2002). Récemment, il a été mis en évidence un défaut de phosphorylation du complexe I dans la trisomie 21, responsable d'un déficit d'activité du complexe I et d'une surproduction de ROS (Valenti et al., 2011). De la même manière un défaut du niveau d'acétylation sous la dépendance d'enzymes désacétylases NAD-dépendantes pourrait moduler l'activité du complexe I. Dans le foie de souris *SIRT3*<sup>-/-</sup>, le niveau d'acétylation du complexe I de la chaîne respiratoire est augmentée et associée à une diminution de la consommation d'oxygène mitochondriale avec des substrats du complexe I (glutamate + malate) suggérant ainsi que *SIRT3* pourrait être impliquée dans la régulation du fonctionnement mitochondrial *via* la déacétylation du complexe I (Ahn et al., 2008).

La dernière hypothèse concerne le rôle de GDAP1 dans la dynamique mitochondriale. La relation structure/fonction mitochondriale est mal connue et il est possible que l'altération des mécanismes de fusion/fission conduise à perturber le fonctionnement des OXPHOS et plus particulièrement le complexe I. De plus, l'association d'un déficit bioénergétique mitochondrial et l'altération de la dynamique mitochondriale peut conduire à un défaut de

transport mitochondrial dans les axones des neurones. Cette hypothèse est actuellement évoquée dans la physiopathologie du CMT2A2 lié à des mutations de *MFN2*. Des études histologiques ont montré des agrégats de mitochondries dans les parties distales des axones des nerfs suraux (Vallat et al., 2008) et un déficit du transport mitochondrial a été mis en évidence dans des axones de neurones provenant de ganglions de racines postérieures de rats exprimant des mutations *MFN2* (Baloh et al., 2007). Dans le cas du CMT4A/2K, une hypothèse similaire peut être émise, confortée par une récente étude montrant des agrégats mitochondriaux dans des axones de patients porteurs de la mutation p.R120W dans le gène *GDAP1* (Sivera et al., 2010). L'étude d'un CMT axonal rare tel que le CMT2K est essentielle à la compréhension des mécanismes physiopathologiques impliqués dans les autres formes de CMT axonaux.

### **III. Article n°4**

Article 4 :

**A new Locus-specific Database for mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated-protein 1 (*GDAP1*) gene**

Cassereau J, Chevrollier A, Procaccio V, Reynier P, Bonneau D and Ferré M

Manuscrit en préparation

## III.1. Introduction

Notre travail de revue des données cliniques et électrophysiologiques des CMT4A/2K, montre l'hétérogénéité des descriptions et la difficulté d'établir des corrélations génotype-phénotype et il est nécessaire que d'autres patients et d'autres mutations soient décrits de façon détaillée. Toutes les pathologies rares nécessitent de partager le maximum d'informations cliniques et biologiques afin d'améliorer les connaissances sur ces maladies.

L'organisation de la connaissance médicale dans des bases de données remonte aux années 70 avec la publication de l'ouvrage de Victor A. McKusick, *Mendelian Inheritance in Man*, et dont les versions actualisées sont disponibles sur le site Web du NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>). Aujourd'hui, des milliers de maladies génétiques ont été décrites et des dizaines de milliers de mutations ont été rapportées.

L'utilisation de technologies toujours plus performantes pour étudier les gènes, telles que le séquençage haut débit, génère une énorme quantité de données, qui s'accumulent considérablement. Pour que cette quantité importante d'informations soit utilisable, des systèmes bio-informatiques (banques de données) ont été développés afin que les experts d'un gène ou d'une maladie (appelés *curators* par les anglo-saxons) puissent collecter, classer, archiver des données de qualité recueillies de façon homogène. Ces données doivent se voir assigner une signification biologique et être reliées à des descriptions phénotypiques standardisées afin de les rendre ensuite accessibles à la communauté scientifique et médicale. Pour cela, de nouveaux outils ont été développés : les bases de données de mutations généralistes et les bases de données spécifiques de gènes (*Locus Specific Databases, LSDB*). La collection de données généraliste la plus connue est la *Human Gene Mutation Database* (HGMD, <http://www.hgmd.org/>). Dans ce type de bases de données, les mutations sont extraites automatiquement par des outils d'exploration de données depuis les publications. En revanche, les LSDB recueillent toutes les mutations publiées et non publiées d'un gène spécifique. Ces banques sont les plus exhaustives car elles sont en général développées et entretenues par un ou plusieurs expert(s) ayant un intérêt particulier pour le gène. Une LSDB rassemble les mutations et polymorphismes identifiés dans les familles présentant une maladie mendélienne donnée. Les plus perfectionnées intègrent aussi des informations cliniques et biologiques utiles pour le diagnostic, le pronostic ou l'étude des corrélations génotype-phénotype. Des informations sur l'origine géographique ou ethnique, la fréquence des mutations et variations dans la population, les mutations récurrentes et les points chauds mutationnels peuvent aussi être disponibles. Les données sont issues de la littérature ou



soumises directement au « curateur », ce qui permet de recueillir un grand nombre d'informations qui seraient restées confidentielles dans des services cliniques et biologiques.

Afin d'éviter l'utilisation de différents systèmes d'annotation des diverses séquences génomiques et d'éviter à une impasse sémantique dans la nomenclature des mutations, une nomenclature « universelle » est imposée afin de décrire de façon unique et non équivoque toute variation de séquence pathogène ou non pathogène. Antonarakis et den Dunnen ont joué un rôle majeur dans l'élaboration de ces recommandations (den Dunnen and Antonarakis, 2000). La description complète du système de nomenclature, en évolution continue, est consultable sur le site internet de la société savante dont le but est de favoriser la découverte et la caractérisation des variations du génome (Human Genome Variation Society ; HGVS ; <http://www.HGVS.org/mutnomen/>).

C'est dans ce contexte que la *Leiden Open-source Variation database* (LOVD) a été créée (Fokkema et al., 2005; Fokkema et al., 2011). Il s'agit d'une LSDB dont le but est de développer un système simple de base de données pour la collecte et l'affichage des variations de séquence de gènes. Ce système répond aux exigences suivantes : être libre, indépendant de la plate-forme et faire appel à une architecture web communément utilisée (PHP et MySQL), sa configuration et sa maintenance doivent être faciles et la LSDB doit suivre les recommandations actuelles de la HGVS. Cette LSDB incorpore un système informatique de vérification de la nomenclature des variations de séquence: il s'agit de l'outil Mutalyzer qui permet de générer et/ou de vérifier la nomenclature des variations au moment de la saisie de chaque mutation ou variation (<http://www.mutalyzer.nl/>).

La dernière version de cette base de données (LOVD v.2.0) présente une flexibilité et des fonctionnalités accrues avec la capacité notamment de répertorier des variations de séquence dans plusieurs gènes par patient. Cette structure dynamique permet également aux gestionnaires d'ajouter des colonnes personnalisées. Nous avons utilisé cet outil logiciel pour créer une base de données performante spécifique à GDAP1.

Il existe déjà une base de données rassemblant les informations sur les mutations des gènes conduisant aux différentes neuropathies périphériques héréditaires, dont GDAP1 : c'est la *Base de Données des Mutations des Neuropathies Périphériques Héréditaires* (ou *The Mutation Database of Inherited Peripheral Neuropathies* ; IPNMDB), rendue publique en 1999 dans le cadre de l'*Initiative pour une Base de Données des Mutations de l'Organisation du Génome Humain* (HUGO). Cette base de données est consultable sur le site internet <http://molgen-www.uia.ac.be/CMTMutations/>. Cependant, concernant GDAP1, la base de données n'a pas été mise à jour depuis 2007 et ne comporte pas de données cliniques

suffisantes pour établir des corrélations génotype-phénotype. De plus, cette base de données ne répertorie que les mutations publiées et ne permet pas d'évaluer la fréquence de chaque mutation et les points chauds mutationnels.

Nous avons créé une base de données spécifique au gène GDAP1 afin de collecter toutes les variations de séquence pathogènes ou non pathogènes, publiées ou non publiées. Cet outil permet de soumettre directement de nouvelles mutations ou de nouveaux patients, en y associant des informations cliniques et électrophysiologiques utiles pour l'étude des corrélations génotype-phénotype. Cette base de donnée offre également la possibilité de décrire des mutations dans plusieurs gènes pour un même patient. L'article 4 présente cette base et l'analyse des données.

## **III.2. Article n°4**

### **A new Locus-specific Database for mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated-protein 1 (*GDAP1*) gene**

Cassereau J, Chevrollier A, Procaccio V, Bonneau D, Reynier P and Ferré M

**Manuscrit en préparation**

**A new Locus-specific Database for mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated-protein 1 (*GDAP1*) gene**

Julien Cassereau<sup>1,2,3,5</sup>, Arnaud Chevrollier<sup>1,2,4</sup>, Vincent Procaccio<sup>1,2,4,5</sup>, Dominique Bonneau<sup>1,2,4,5</sup>, Pascal Reynier<sup>1,2,4,5</sup> and Marc Ferré<sup>1,2,4</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U771, Angers, F-49000, France

<sup>2</sup>CNRS, 6214, F-49000 Angers, France

<sup>3</sup>University Hospital of Angers, Department of Neurology, Angers, F-49000, France

<sup>4</sup>University Hospital of Angers, Department of Biochemistry and Genetics, Angers, F-49000, France

<sup>5</sup>University of Angers, Angers, F-49000, France

**Corresponding Author:**

Vincent Procaccio

Biochemistry and Genetics Laboratory

National Center for Neurodegenerative and Mitochondrial diseases

CHU Angers

4 rue Larrey

49933 Angers

France

Phone 33 2 41 35 78 54

Fax 33 2 41 35 40 17

Email : ViProcaccio@chu-angers.fr

**Abstract:**

The establishment of Locus Specific Databases (LSDB) is a crucial tool for rare diseases, and one of the aims of the Human Variation Project. We report the development of a publicly accessible LSDB for the ganglioside-induced differentiation-associated-protein 1 gene (*GDAP1*) involved in Charcot-MarieTooth disease (CMT) accessible at <http://mitodyn.org>. CMT disease represents a large group of clinically and genetically heterogeneous disorders leading to inherited peripheral neuropathies affecting motor and sensory neurons. Mutations in the *GDAP1* gene, which encodes a protein anchored to the mitochondrial outer membrane, are usually associated with recessive forms of CMT (CMT4A and AR-CMT2) and only rarely with the autosomal dominant forms (CMT2K). The phenotypic presentations of patients carrying *GDAP1* mutations are heterogeneous and it is difficult to make genotype-phenotype correlations, since the majority of description mutation occurs in few isolated patients. The *GDAP1* LSDB adopted the Leiden Open Variation database (LOVD) software platform. This database contains 54 unique variants reported in 158 patients. Analysis of molecular, clinical data and electrophysiological phenotypes are described in detail.

Keywords : Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/2K- *GDAP1*- LOVD- LSDB

## Introduction

Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is one of the commonest causes of inherited peripheral neuropathies with a prevalence of about 10–30 per 100,000, depending on the country of origin (Emery, 1991). CMT neuropathies are characterized clinically by progressive sensory loss, weakness, muscle atrophy, loss of deep tendon reflexes, and foot deformities. To date, about forty genes have been found responsible for CMT. Some of these genes encode mitochondrial proteins, i.e. mitofusin 2 (*MFN2*) and ganglioside-induced differentiation-associated-protein 1 (*GDAP1*). *GDAP1* mutations are responsible for Charcot-Marie-Tooth disease, type 4A (CMT4A; MIM# 214400) (Baxter et al., 2002), the most frequent recessive subtype of demyelinating CMT; for AR-CMT2 (MIM#607776) (Cuesta et al., 2002), the axonal recessive subtype; for CMTRIA (MIM#608340) (Senderek et al., 2003), the intermediate recessive CMT; and for CMT2K (MIM#607831) (Cassereau et al., 2009; Chung et al., 2008; Claramunt et al., 2005), the rare dominant subtype.

The gene locus was first identified on chromosome 8q13-q21 (CMT4A) in Tunisian families, and associated with slow MNCV and hypomyelination detected by nerve biopsy (Ben Othmane et al., 1993). The corresponding gene, *GDAP1*, was identified by Baxter et al. (2002). *GDAP1* was previously identified as one of ten cDNAs expressed in a differentiated Neuro2a mouse neuroblastoma cell line, in which cholinergic differentiation with neurite sprouting had been induced by transfection of GD3 synthase ( $\alpha$ 2,8 sialyltransferase) cDNA (Liu et al., 1999).

The *GDAP1* gene, with a length of 23,728 base pairs (bp), contains six exons and five introns. Two transcript variants of *GDAP1* have been identified. Transcript variant 1, representing the longer variant, encodes the longer isoform, designated as isoform a (358 amino acids). Transcript variant 2, encoding isoform b, contains an alternate in-frame exon, uses an alternate splice site in the 5' coding region, and a downstream start codon, compared to transcript variant 1. Isoform b (290 amino acids) has a shorter N-terminal sequence compared to isoform a. mRNA studies using RT-PCR have demonstrated the ubiquitous expression of *GDAP1*, predominantly in nervous tissues (Cuesta et al., 2002).

Phylogenetic and structural analyses suggest that *GDAP1* belongs to a subfamily of glutathione-S-transferases (GSTs) (Cuesta et al., 2002; Marco et al., 2004; Shield et al., 2006). *GDAP1* has two typical GST domains, domain I (GST-N) at the N-terminal region and domain II (GST-C) at the C-terminal region. These domains were predicted using bioinformatics tools (Cuesta et al., 2002; Marco et al., 2004) and no functional GST activity

has been demonstrated so far (Pedrola et al., 2005; Shield et al., 2006). It has been also shown that GDAP1 has a single transmembrane domain (TMD) at the extremity of the C-terminal, and a hydrophobic domain (HD) in the flanking C-terminal region (Marco et al., 2004; Wagner et al., 2009). Moreover, GDAP1 has two additional regions between amino acids 152-164 and 169-195 which are predicted to represent two helices,  $\alpha$  4 and  $\alpha$  5, constituting the  $\alpha$ 4- $\alpha$ 5 loop.

Several studies have suggested that GDAP1 plays a role in mitochondrial fission (Niemann et al., 2005; Pedrola et al., 2008). It was shown that the TMD plays a key role in mitochondrial targeting and mitochondrial membrane insertion (Wagner et al., 2009). On the C-terminal side, positively charged amino acids flanking the TMD control both mitochondrial targeting and the fission function of GDAP1. The hydrophobic domain (HD) seems essential for mitochondrial fission mediated by GDAP1. We have recently shown that *GDAP1* mutations in fibroblasts from CMT2K patients are associated with mitochondrial complex I defect (Cassereau et al., 2009).

The examination of the relationship between the genotype and the phenotype of the various forms of CMT disease involving *GDAP1* mutations shows that the recessive forms are generally far more severe than the dominant forms. In particular, in the recessive forms, the truncating mutations have a more severe phenotype, with early onset and rapid progression of the disease leading to the inability to walk by the age of 10, generally followed by wheelchair dependence before the end of the third decade (Cassereau et al., 2011b).

However, the phenotypic presentations of patients carrying *GDAP1* mutations are heterogeneous. Regarding the age of onset and the age of functional disability, there is not only a large clinical variability among patients carrying the same mutations (Moroni et al., 2009) but also a significant intrafamilial variability (Azzedine et al., 2003). It is difficult to make phenotype-genotype correlations for GDAP1 gene mutations, since the majority of description mutation occurs in few isolated patients. The analysis of a larger number of cases of CMT disease involving *GDAP1* mutations, along with detailed clinical, electrophysiological and pathological data, will be required to establish a reliable relationship between the genotype and phenotype of the different forms of the disease.

We have developed a web-based locus-specific database (LSDB) for *GDAP1* sequence variations with short publication delays. We here describe the construction of the database, the procedure for data submission, and the presentation of the data.

### **The *GDAP1* Database development, curating procedure, and nomenclature.**

We established a Locus-Specific Database (LSDB) for *GDAP1* using the Leiden Open (Source) Variation Database (LOVD) version 2 build 31 system (Fokkema et al., 2011). This database includes a total of 20 variant items and 18 clinical/patient items (example of an entry in Figure 1). A standardized description of the clinical and molecular items was set up using drop-down lists with predefined variables. The clinical features were based on the usual symptoms of mitochondrial diseases.

The data is accessible to the public and will be a valuable tool for both clinicians and researchers as it will contain both published and unpublished sequence variants. Contributors can submit their variants online to the database upon registration for a login and password (to collect contact information for reference purposes and clarification of submitted data). The mutational data description was confirmed using the Web-based software Mutalyzer, to which LOVD software is currently also linked (Wildeman et al., 2008). Variations submitted directly to the LSDB were rechecked with these tools. All putative novel mutations were detected in affected patients, segregated with disease status and were not present in control individuals.

Informations of the database correspond to a reviewing of all the clinical and molecular data of patients carrying *GDAP1* mutations published in peer-reviewed literature. While most variants can be described in the latest update of the standard nomenclature ([www.hgvs.org/mutnomen](http://www.hgvs.org/mutnomen)) (den Dunnen and Antonarakis, 2000; den Dunnen and Paalman, 2003), some inaccuracies may persist because gene anomalies discovered earlier might have been named according to a convention now out of use. Eventually, the “DNA published” field of the page dedicated to each variant (Figure 1a) indicates whether the name of the mutation has been modified by the Curator. The *GDAP1* LSDB website will require absolute compliance with the rules set out above to describe sequence variants in order to provide uniform and comparable data.

The *GDAP1* mutations are described according to the *GDAP1* transcript variant 1 (RefSeq: NM\_018972.2), containing 6 exons and encoding an isoform (a) of 358 amino acids. Nucleotide numbering of nuclear genes reflects cDNA numbering with +1 corresponding to



the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence, according to journal guidelines. The initiation codon is codon 1.

Pathogenicity criteria is stated in the *Variant data* fields *Reported pathogenicity* and *Concluded pathogenicity* (Figure 1a). It is dependent on clinical context and molecular findings. Putative novel mutations detected in affected patients must segregate with disease status and must not be present in control individuals. Putative mutations were graded according to type of mutation: frameshift and nonsense mutations were considered to be probably pathogenic. Missense mutations were denoted as “pathogenicity unknown” when detected in single families or “probably pathogenic” when detected in some families. Missense mutations were considered to be pathogenic when proven by experimental evidence or detected in multiple families.

## **Database content analysis**

### **Type of mutations and affected domains**

To date, the GDAP1 database contains 54 unique variants whose four of them are considered as non pathogenic sequence variants (NPSV). Pathogenic mutations, which affect the coding sequence of the gene, are more frequently found in exon 3 (15 mutations) and exon 6 (13 mutations) (figure 2a). The most frequent mutational protein consequences are missense 31/50 (62%) mutations. In addition, nine frameshifts (18%), seven nonsense (14%) and three splice-site (6%) mutations have also been reported (figure 2b).

Few mutations are recurrent, however, some are frequently reported: the c.581C>G mutation (p.Ser194X) reported 38 times in Spain, Morocco and Tunisia, the c.487C>T mutation (p.Gln163X) reported 34 times essentially in Spain, the c.715C>T mutation (p.Leu239Phe) reported 28 times essentially in Eastern Europe and the c.358C>T mutation (p.Arg120Trp) was reported 17 times, essentially in Spain.

Among all pathogenic variants reported in the database, 58% are located into GST domains of the protein, highlighting an important role of these domains in protein function as recently mentioned (Crimella et al., 2010). Among the 31 missense mutations, 20 (65%) affect GST domains (6 in GST-N and 14 in GST-C), 4 (13%) the  $\alpha 4\alpha 5$  loop, 1 (3%) the HD

domain, 1 (3%) the TMD domain and 5 (16%) missense mutations affect any particular domain of the protein (figure 2c). Interestingly, 4/6 missense mutations involved in CMT2K are located into GST domains (p.Ser34Cys in GST-N, and p.Gln218Glu, p.Arg226Ser and p.Cys240Tyr in GST-C).

In the same way, in patients presenting with recessive form of the disease associated with homozygous missense mutations, 35/45 (78%) harbor mutations located into GST domains (12 in GST-N and 23 in GST-C). In addition, truncating mutations located before aminoacid 287 affect at least one GST domain, which is the case in almost all truncating mutations reported.

### **Clinical data**

To date, 158 patients (81 females, 66 males and 11 not available) are currently reported in the database: 26 with a dominant form CMT2K, 126 with a recessive form (CMT4A, AR-CMT2 or CMTRIA) and 6 patients are difficult to classify, either because the authors suspected mutation on the second allele, or because the pathogenicity of the second variant is uncertain. All clinical data had been collected in database in the exception of 28 patients for which clinical data entry was insufficient for phenotype classification.

Clinical severity was evaluated by the age of onset of the disease : before 10 years, between 11 and 30 years, after 30 years or asymptomatic, and by walking disability : independent, with technical support or wheelchair-bound, before or after age 30.

Phenotypic data was correlated with the mutational data in different distinct ways in patients with sufficient clinical data for each item:

- the age of onset according to: (1) the mode of inheritance (dominant or recessive); and (2) the affected domains for dominant forms (GST domains,  $\alpha 4\alpha 5$  loop, transmembrane domain, hydrophobic domain or non-specific domain);
- the walking disability according to: (1) the mode of inheritance (dominant or recessive); and (2) the predicted effect at the protein level: truncating mutations or missense mutations

Data analysis shows that patients with a recessive form of the disease present a more severe phenotype than those with a dominant form (Table I). The first symptoms appear before age of ten in 99% of patients presenting with a recessive form versus 19% in dominant forms. Thirty-five percent of patients with a dominant form (CMT2K) are asymptomatic until 30 years, whereas all patients with a recessive form have symptoms before the end of the

adolescence. Among dominant forms, symptoms appear before 10 years old in 37.5% of patients harboring mutations in GST domains versus 6% when mutations affect any specific domain (Table I). Interestingly, almost all patients with mutations in GST domains are symptomatic after 35 years old whereas 35% of patients with mutations in non-specific domain are asymptomatic at least until 30 years old (Table I). These findings suggest that mutations affecting GST domains are responsible for a more severe phenotype probably by a different pathophysiological mechanism.

Evolution of the CMT disease associated to GDAP1 mutations is more rapid in recessive forms than dominant forms. Twenty-seven percent of AR-CMT patients are wheelchair-bound before 30 years and 76% after 30 years, and generally wheelchair-bound is almost constant after 40 years (Table II). Any AR-CMT patient walks independently after 30 years. In CMT2K patients, 83% walk independently before 30 years and only 1/20 (5%) CMT2K patient over 30 years reported in the database is wheelchair-bound at age 50. Eighty percent of CMT2K patients walk independently after 30 years (Table II).

Nonsense and frameshift mutations are more often associated with a severe phenotype than missense mutations. Although in both cases all patients need technical assistance over 30 years, the evolution is more rapid in patients with homozygous truncating mutations: almost all patients over 30 years (93%) are wheelchair bound versus 50% in patients harboring missense mutations (Table II).

A greater number of cases of CMT disease involving GDAP1 mutations, along with detailed clinical, electrophysiological and pathological data, will be required to improve relationship between the genotype and phenotype of the different forms of the disease. This is the aim of our database.

### **Electrophysiological data**

On the basis of electrophysiologic criteria, CMT diseases are commonly classified in two major categories: the demyelinating form, characterized by slow motor median nerve conduction velocity (MNCV), and the recessive and dominant axonal forms, with a normal or only slightly reduced Motor Nerve Conduction Velocity (MNCV). It is usual also to take into account the notion of "intermediate" forms of CMT. Thus, the demyelinating forms could be

defined by MNCV of the median nerve at or below 30 m/s, axonal forms by the median nerve MNCV above 40 m/s, and intermediate forms by the median nerve MNCV between 30 and 40 m/s (Dubourg, 2004). Thus, we have included electrophysiological data following these categories in our database in order to characterize the neuropathies associated to *GDAP1* mutations. To determine the type of neuropathy, we need to report not only the MNCV but also the compound motor action potential (CMAP), reflecting the axonal loss. *GDAP1* mutations have been described as responsible for demyelinating forms (CMT4A), axonal forms (AR-CMT2 and CMT2K) and intermediate forms of CMT (CMTRIA).

In our database, electrophysiological parameters are reported for all patients except for 38 patients for which electrophysiological data are not sufficient. Thus, our analysis concerns 120 patients. Among them, 30 patients (25%) had not recordable median nerve parameters suggesting a severe axonal loss (Table III). Sixty-eight patients (57%) are reported with MNCV > 40 m/s corresponding to axonal forms, thirteen patients (11%) with MNCV between 31 and 40 m/s and nine patients (7%) with MNCV < 30 m/s corresponding to the classical definition of demyelinating forms (Table III). However, all reduced velocities < 30 m/s (100%) were associated with major amplitude reductions, less than 0.5 mV. In the same way, 85% of patients with MNCV between 31 and 40 m/s have CMAP < 6 mV, whose 62% < 1 mV, at early age, more often before 5y (Table III). These electrophysiological findings favoured severe axonal neuropathies with secondary demyelination in CMT-associated to *GDAP1* mutations.

Indeed, usually, in demyelinating forms of CMT disease affecting myelinic proteins such as CMT1A, CMT1B (Birouk et al., 1997; Hattori et al., 2003; Lewis et al., 2000) or in others CMT4 (Dubourg et al., 2006), conduction slowing < 30 m/s is present since the early phases of myelination, it is definitely established within the age of 3–5 years, it does not significantly change over time, independently from clinical severity and progression, and it is therefore a marker of disease even in asymptomatic patients. Whereas the amplitudes that were initially normal progressively decreased over time following secondary axonal loss. In addition, we have previously shown that all histopathological analysis of nerve biopsies described in cases of CMT disease involving *GDAP1* mutations revealed a loss of the large myelinated fibres which is known to reduce the MNCV (Cassereau et al., 2011b). Thus, the loss of larger fibres may explain the lower MNCV reduction found in these severe cases.

In conclusion, our message is that mutations in *GDAP1* are responsible for primary axonal damage with secondary demyelination in the most severe cases, which seems important in understanding the pathophysiology of the disease.

## **Future prospects**

Interestingly, a patient referred to our database, mutated for the GDAP1 gene, is also carrying a mutation in the MFN2 gene (Cassereau et al., 2011a). Other cases have been brought to our attention (proceedings...). This becomes increasingly common with the genetic studies becoming more and more global.

That's the reason why mitodyn database will incorporate other genes involved in diseases affecting the mitochondrial dynamics and bioenergetic. Thus the OPA1 LSDB (*eOPA1*) (Ferre et al., 2005), curated by our laboratory, will soon be transferred to mitodyn.org. We will then integrate MFN2, responsible for CMT2A2 (Zuchner et al., 2004), and DRP1 associated to encephalopathy with lactic acidosis (Waterham et al., 2007). These different diseases involving mitochondrial dysfunction could concern not only the same practitioners and researchers, but also may involve the same patients. Thus, in the future, we hope to refine genotype-phenotype correlations on the diseases of the mitochondrial dynamics, comparing and crossing the clinical, electrophysiological and biochemical data.

## References

- Azzedine H, Ruberg M, Ente D, Gilardeau C, Perie S, Wechsler B, et al. Variability of disease progression in a family with autosomal recessive CMT associated with a S194X and new R310Q mutation in the GDAP1 gene. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 341-6.
- Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, Stajich JE, Hulette C, Dew-Knight S, et al. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 2002; 30: 21-2.
- Ben Othmane K, Hentati F, Lennon F, Ben Hamida C, Blel S, Roses AD, et al. Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1625-8.
- Birouk N, Gouider R, Le Guern E, Gugenheim M, Tardieu S, Maisonobe T, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain* 1997; 120 ( Pt 5): 813-23.
- Cassereau J, Casasnovas C, Gueguen N, Malinge MC, Guillet V, Reynier P, et al. Simultaneous MFN2 and GDAP1 mutations cause major mitochondrial defects in a patient with CMT. *Neurology* 2011a; 76: 1524-6.
- Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, Desquirit V, Verny C, Nicolas G, et al. Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease involving GDAP1 mutations. *Experimental neurology* 2011b; 227: 31-41.
- Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, Malinge MC, Letournel F, Nicolas G, et al. Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics* 2009; 10: 145-50.
- Chung KW, Kim SM, Sunwoo IN, Cho SY, Hwang SJ, Kim J, et al. A novel GDAP1 Q218E mutation in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Hum Genet* 2008; 53: 360-4.
- Claramunt R, Pedrola L, Sevilla T, Lopez de Munain A, Berciano J, Cuesta A, et al. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet* 2005; 42: 358-65.
- Crimella C, Tonelli A, Airoidi G, Baschirotto C, D'Angelo MG, Bonato S, et al. The GST domain of GDAP1 is a frequent target of mutations in the dominant form of axonal Charcot Marie Tooth type 2K. *J Med Genet* 2010; 47: 712-6.
- Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, Garcia-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, et al. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 2002; 30: 22-5.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 2000; 15: 7-12.
- den Dunnen JT, Paalman MH. Standardizing mutation nomenclature: why bother? *Hum Mutat* 2003; 22: 181-2.
- Dubourg O. [Charcot-Marie-Tooth disease: from phenotype to genotype]. *Revue neurologique* 2004; 160: 1221-9.
- Dubourg O, Azzedine H, Verny C, Durosier G, Birouk N, Gouider R, et al. Autosomal-recessive forms of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* 2006; 8: 75-86.
- Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991; 1: 19-29.
- Ferre M, Amati-Bonneau P, Tourmen Y, Malthiery Y, Reynier P. eOPA1: an online database for OPA1 mutations. *Human mutation* 2005; 25: 423-8.

- Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Human mutation* 2011; 32: 557-63.
- Hattori N, Yamamoto M, Yoshihara T, Koike H, Nakagawa M, Yoshikawa H, et al. Demyelinating and axonal features of Charcot-Marie-Tooth disease with mutations of myelin-related proteins (PMP22, MPZ and Cx32): a clinicopathological study of 205 Japanese patients. *Brain* 2003; 126: 134-51.
- Lewis RA, Sumner AJ, Shy ME. Electrophysiological features of inherited demyelinating neuropathies: A reappraisal in the era of molecular diagnosis. *Muscle Nerve* 2000; 23: 1472-87.
- Liu H, Nakagawa T, Kanematsu T, Uchida T, Tsuji S. Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *J Neurochem* 1999; 72: 1781-90.
- Marco A, Cuesta A, Pedrola L, Palau F, Marin I. Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol Biol Evol* 2004; 21: 176-87.
- Moroni I, Morbin M, Milani M, Ciano C, Bugiani M, Pagliano E, et al. Novel mutations in the GDAP1 gene in patients affected with early-onset axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A. *Neuromuscul Disord* 2009; 19: 476-80.
- Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 2005; 170: 1067-78.
- Pedrola L, Espert A, Valdes-Sanchez T, Sanchez-Piris M, Sirkowski EE, Scherer SS, et al. Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 679-89.
- Pedrola L, Espert A, Wu X, Claramunt R, Shy ME, Palau F. GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1087-94.
- Senderek J, Bergmann C, Ramaekers VT, Nelis E, Bernert G, Makowski A, et al. Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain* 2003; 126: 642-9.
- Shield AJ, Murray TP, Board PG. Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347: 859-66.
- Wagner KM, Ruegg M, Niemann A, Suter U. Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PLoS One* 2009; 4: e5160.
- Waterham HR, Koster J, van Roermund CW, Mooyer PA, Wanders RJ, Leonard JV. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med* 2007; 356: 1736-41.
- Wildeman M, van Ophuizen E, den Dunnen JT, Taschner PE. Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker. *Human mutation* 2008; 29: 6-13.
- Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 2004; 36: 449-51.

## Figures

**a**

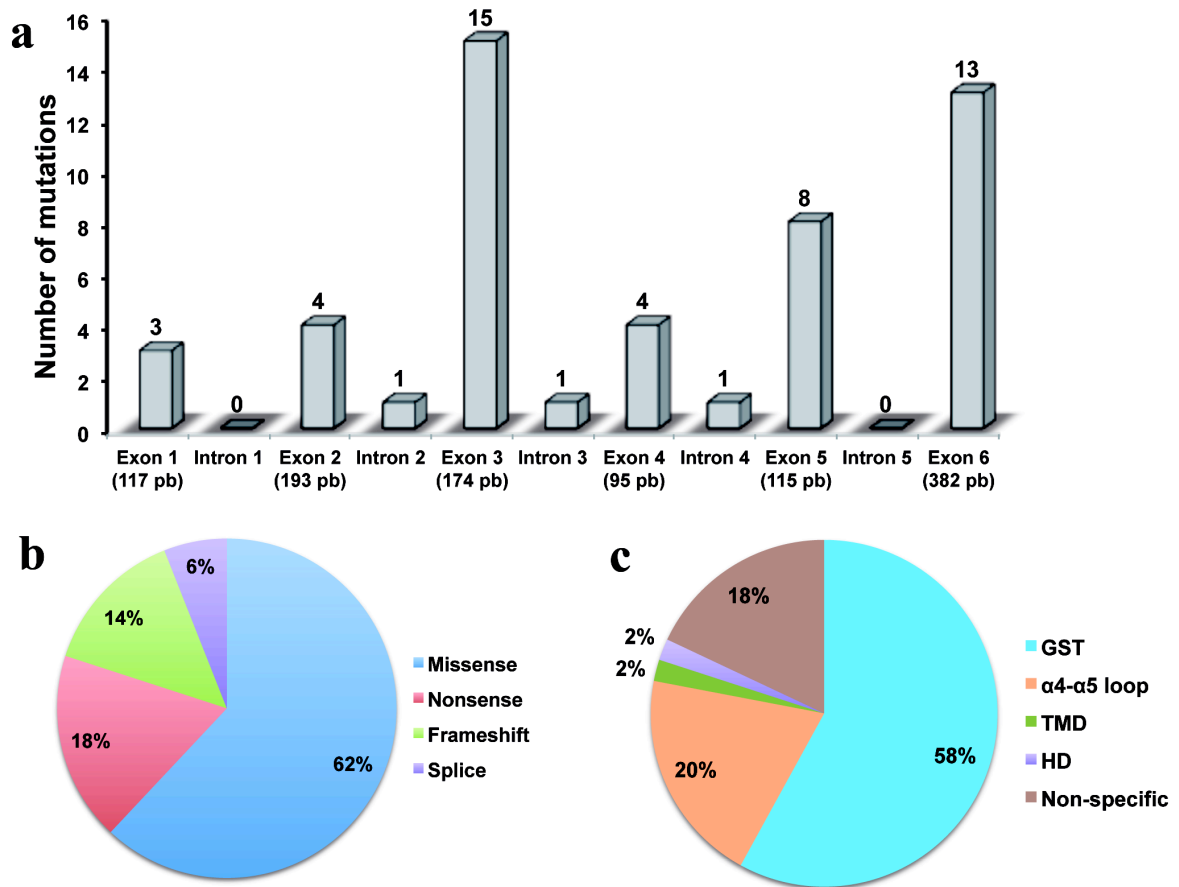
Variant data	
Allele	Maternal (confirmed)
Reported pathogenicity	Pathogenic
Concluded pathogenicity	Probably pathogenic
DB-ID	GDAP1_00008
DNA change	c.719G>A ( <a href="#">View in UCSC Genome Browser</a> )
Type	Substitution
Location	Exon
Exon	6
Affected domain	GST-C (C-term Glutathione-S-transferase)
RNA change	-
Protein	p.(Cys240Tyr)
Reference	<a href="#">Cassereau et al. (2009)</a>
Technique	SEQ
Template	DNA
Tissue	Blood
Re-site	-
DNA published	-
Variant remarks	-
Frequency	-
Status	Public

**b**

Patient data (#0000025)	
Patient ID	CAS#2009_III-1
Gender	Female
Disease	CMT2K
Age of onset	31-40 years
Age at last examination	50 years
Duration of disease	11-20 years
Additional symptoms	-
Functional disability	LL: walking with support-cane/crutch (disease duration < 10 y)
Clinical score	-
Electroneuromyography	Sensori-motor neuropathy, Axonal, Median or ulnar nerves: MNCV > 40, Median or ulnar nerves: CMAP > 6
Ocular electrophysiology	-
Histology	-
Radiology	-
Geographic origin	France
Reference	<a href="#">Cassereau et al. (2009)</a>
Remarks	-
Remarks (non public)	-
# Reported	1

**Figure 1:** Example of a submission from GDAP1 database. **a** : molecular items. **b** : clinical items.





**Figure 2:** Distribution of the 50 pathogenic mutations according to their: **a:** location; **b:** type; and **c:** domain. (pb : pair of base)

**Table I:** genotype-phenotype correlation analysis using GDAP1-LOVD data evaluating the age of onset according to mode of inheritance and affected domains in dominant forms. Values represent the number of patients for each situation and the corresponding percentages are mentioned in brackets. (y : years ; GST : glutathione-transferase domain).

	Age of onset				Total
	≤ 10 y	10-30 y	> 30 y	asymptomatic	
<b>Recessive forms</b>	122 (99.2)	1 (0.8)	0	0	123
<b>Dominant forms</b>	5 (19.2)	12 (42.2)	6 (23.1)	3 (11.5)	26
Domain affected					
GST	3 (37.5)	2 (25)	3 (37.5)	0	8
α4α5-loop	1 (100)	0	0	0	1
non-specific	1 (5.9)	10 (58.8)	3 (17.6)	3 (17.6)	17

**Table II:** genotype-phenotype correlation analysis using GDAP1-LOVD data evaluating walking ability according to mode of inheritance and predicted effect on protein in recessive forms. Values represent the number of patients for each situation and the corresponding percentages are mentioned in brackets. (y : years)

	Walking disability			Total
	Independent	Technical assistance	Wheelchair-bound	
<b>Recessive forms ≤ 30 y</b>	23 (32.9)	28 (40)	19 (27.1)	70
> 30 y	0	6 (24)	19 (76)	25
<i>missense/missense</i> ≤ 30 y	16 (45.7)	10 (28.6)	9 (25.7)	35
> 30 y	0	5 (50)	5 (50)	10
<i>truncating/truncating</i> ≤ 30 y	6 (22.2)	13 (48.2)	8 (29.6)	27
> 30 y	0	1 (6.7)	14 (93.3)	15
<i>missense/truncating</i> ≤ 30 y	1 (12.5)	5 (62.5)	2 (25)	8
> 30 y	0	0	0	0
<b>Dominant forms ≤ 30 y</b>	5 (83.3)	1 (16.7)	0	6
> 30 y	16 (80)	3 (15)	1 (5)	20

**Table III :** analysis of electrophysiological parameters using GDAP1-LOVD data. Values represent the number of patients for each situation and the corresponding percentages are mentioned in brackets. (MNCV : Motor Nerve Conduction Velocity ; CMAP : Compound Motor Action Potential)

	<b>Conduction Velocity (m/s)</b>				
	<b>MNCV &gt; 40</b>	<b>MNCV 31- 40</b>	<b>MNCV ≤ 30</b>	<b>Not recordable</b>	
<b>Amplitude (mV)</b>					
<b>CMAP &gt; 6</b>	28 (41.2)	2 (15.4)	0	/	
<b>CMAP 1.1-6</b>	29 (42.6)	3 (23.1)	0	/	
<b>CMAP 0.5-1</b>	6 (8.8)	3 (23.1)	0	/	
<b>CMAP &lt; 0.5</b>	5 (7.4)	5 (38.5)	9 (100)	/	
<b>Not recordable</b>	/	/	/	30	
<b>Total</b>	<b>68 (56.7)</b>	<b>13 (10.8)</b>	<b>9 (7.5)</b>	<b>30 (25)</b>	<b>120</b>

### III.3. Résultats et discussion

Afin de contribuer à une meilleure compréhension de l'implication de GDAP1 dans la physiopathologie du CMT4A/2K, nous avons développé une base de données spécifique dédiée à ce gène (<http://mitodyn.org/>) répertoriant les variations de séquence publiées, pathologiques ou non, et permettant également des soumissions directes de la part d'autres laboratoires. Des données cliniques et paracliniques pour chaque patient sont intégrées à cette base de données qui est un outil utile pour le diagnostic moléculaire, les études statistiques et la détermination de corrélations génotype-phénotype dans cette maladie.

Nous avons répertorié les différents variants en suivant les recommandations de la HGVS et la séquence de l'ADNc tirée du National Centre for Biotechnology Information (NCBI) (numéro d'accèsion NM\_018972.2). L'analyse de ces variants à l'aide de l'outil mutalyzer a permis de corriger certaines erreurs commises dans la nomenclature de certains variants décrits dans plusieurs publications (Table II).

**Table II: Variants présents dans la base de données dont la nomenclature a été modifiée** suite à l'analyse par l'outil mutalyzer et en suivant les recommandations de l'HGVS.

ID Variant	Variant publié	Variant modifié	Référence
GDAP1_00001	c.23delAG	c.27_28del	Crimella et al. (2010)
GDAP1_00047	c.102G>C	c.102C>G	Sahin-Calapoglu et al. (2009)
GDAP1_00012	c.342-345delAAAG	c.341_344del	Claramunt et al. (2005)
GDAP1_00015	c.349_350insT	c.349dup	Senderek et al. (2003)
GDAP1_00016	c.507G>T	c.507T>G	Senderek et al. (2003) Di Maria et al. (2004)
GDAP1_00046	c.IVS5+24C>T	c.694+24C>T	Sahin-Calapoglu et al. (2009)
GDAP1_00022	c.863insA	c.862dup	Cuesta et al. (2002) Sevilla et al. (2003) Claramunt et al. (2005) Sevilla et al. (2008)

L'analyse de cette nouvelle base de données a permis de confirmer que les formes récessives sont plus sévères que les formes dominantes. De plus, parmi les formes récessives, les mutations tronquantes sont responsables d'une évolution plus rapide de la maladie avec une dépendance au fauteuil roulant quasi constante avant l'âge de 40 ans. Nous avons également montré l'importance des domaines GST, affectés dans la majorité des mutations, et associés à des phénotypes plus sévères notamment dans les formes à transmission dominante de la maladie. Les données électrophysiologiques des patients inclus dans la base permettent de suggérer l'atteinte primitivement axonale de la maladie et l'absence de forme purement démyélinisante comme nous l'avons déjà mentionné dans l'article 3.

A moyen terme, l'objectif est d'inclure d'autres protéines impliquées dans la dynamique mitochondriale telles que OPA1, MFN2 et Drp1. Les maladies neurodégénératives associées à ces gènes sont prises en charge par les mêmes médecins et intéressent les mêmes équipes de recherche. De plus, un même patient peut être affecté par des mutations dans plusieurs de ces gènes. En effet, nous avons déjà répertorié un patient porteur de mutations à la fois dans GDAP1 et dans MFN2 (Cassereau et al., 2011), et prochainement d'autres patients également mutés dans ces deux gènes seront intégrés à la base de données. Il nous semble donc important de croiser les données génétiques et cliniques de ces patients afin d'améliorer la stratégie diagnostique de ces maladies. C'est dans cette perspective que nous avons nommé notre base de données « mitodyn » pour « MITOchondrial DYNamics ». Prochainement, nous transférerons la base de données eOPA1 créée par notre laboratoire (Ferre et al., 2005) dans cette nouvelle base de données (mitodyn.org). Nous souhaitons également intégrer à terme les résultats des analyses biochimiques et d'imagerie mitochondriale publiés et réalisés à partir de fibroblastes de patients.

## **IV. Article n°5**

Article 5 :

**Oxidative stress contributes to the pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2K**

Cassereau J, Chevrollier A, Goizet C, Gueguen N, Desquirit-Dumas V, Angebault C, Verny C, Amati-Bonneau P, Reynier P, Bonneau D, Procaccio V.

Manuscrit en préparation

## IV.1. Introduction

L'analyse des corrélations génotype-phénotype, montre que les mutations affectant les domaines GST sont responsables de phénotypes plus sévères avec un âge de début plus précoce et une évolution plus rapide notamment dans les formes dominantes de la maladie.

L'objectif des travaux présentés dans l'article 5 était de comparer le métabolisme énergétique mitochondrial dans deux familles CMT2K dont l'une porte la mutation p.C240Y dans le domaine C-GST (décrite dans l'article 1) et l'autre la mutation p.R120W n'affectant aucun domaine spécifique de la protéine. Nous avons étudié la chaîne respiratoire chez les trois patients porteurs de la mutation p.R120W à l'état hétérozygote, afin de confirmer le déficit fonctionnel du complexe I mis en évidence dans la première famille.

Afin d'expliquer l'origine du déficit du complexe I, nous avons étudié, par la réalisation de Western blots des différents complexes de la chaîne respiratoire et par la réalisation de technique de séparation en gel de polyacrylamide (blue Native PAGE), le complexe I sous sa forme native. Ces analyses ont permis de déterminer s'il existait un déficit quantitatif ou un défaut d'assemblage du complexe I.

L'implication de la chaîne respiratoire mitochondriale dans la physiopathologie du CMT associé aux mutations de GDAP1, conduit à explorer le stress oxydant. Nous avons quantifié de la production de radicaux libres mitochondriaux par microscopie à fluorescence (sonde MitoSox<sup>®</sup>), par le dosage de l'activité enzymatique de l'aconitase matricielle, par le dosage des groupements thiols, ainsi que par l'analyse par western blot de l'enzyme antioxydante MnSOD. Cela a permis d'évaluer si le stress oxydant est commun à tous les patients ou s'il existe un caractère dépendant de la localisation de la mutation dans la protéine.

Enfin, nous avons évalué l'effet du resvératrol, une molécule antioxydante et également activatrice des sirtuines impliquées dans la biogenèse mitochondriale.

## **IV.2. Article n°5**

### **Oxidative stress contributes to the pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2K**

Cassereau J, Chevrollier A, Goizet C, Gueguen N, Desquirit-Dumas V, Angebault C,  
Verny C, Amati-Bonneau P, Reynier P, Bonneau D, Procaccio V.

**Manuscrit en préparation**



**Oxidative stress contributes to the pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2K**

Julien Cassereau<sup>1,2,4,6</sup>, Arnaud Chevrollier<sup>1,2,5</sup>, Cyril Goizet<sup>3</sup>, Naïg Gueguen<sup>1,2,5</sup>, Valérie Desquiret-Dumas<sup>1,2,5</sup>, Claire Angebault<sup>1,2,6</sup>, Christophe Verny<sup>1,2,4,6</sup>, Patrizia Amati-Bonneau<sup>1,2,5</sup>, Pascal Reynier<sup>1,2,5,6</sup>, Dominique Bonneau<sup>1,2,5,6</sup> and Vincent Procaccio<sup>1,2,5,6</sup>

<sup>1</sup>INSERM, U771, Angers, F-49000, France

<sup>2</sup>CNRS, 6214, F-49000 Angers, France

<sup>3</sup> University Hospital of Bordeaux, Department of Medical Genetics, 33076 Bordeaux, France

<sup>4</sup>University Hospital of Angers, Department of Neurology, Angers, F-49000, France

<sup>5</sup>University Hospital of Angers, Department of Biochemistry and Genetics, Angers, F-49000, France

<sup>6</sup>University of Angers, Angers, F-49000, France

**Corresponding Author:**

Vincent Procaccio

Biochemistry and Genetics Laboratory

National Center for Neurodegenerative and Mitochondrial diseases

CHU Angers

4 rue Larrey

49933 Angers

France

Phone 33 2 41 35 78 54

Fax 33 2 41 35 40 17

Email : ViProcaccio@chu-angers.fr

**Running Title:** Oxidative stress and Charcot-Marie-Tooth disease type 2K

**Abstract:**

Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is the most common cause of inherited peripheral neuropathies. Demyelinating (CMT4A) and axonal (CMT2K) forms of CMT are associated with *GDAP1* gene mutations. *GDAP1* is located in the outer mitochondrial membrane and takes part of the mitochondrial network dynamics. In CMT2K patients fibroblasts, dominant mutation p.C240Y of *GDAP1* has recently been associated with a mitochondrial NADH ubiquinone oxidoreductase defect. We here explore the metabolic relationship between *GDAP1* mutations and the complex I decrease activity.

Using CMT2K fibroblasts with p.C240Y or p.R120W mutations, we showed that mitochondrial complex I deficiency was associated with an energetic glycolytic switch and revealed a significant reduction of sirtuin 1 isoform, a major deacetylase sensitive to cellular redox state. The p.C240Y mutation located in the glutathione-S-transferase domain was associated with a main mitochondrial oxidative stress as compared to p.R120W mutation located in an unrelated sequence. However, both CMT2K fibroblasts treated with resveratrol, a polyphenol with antioxidant properties, restored complex I activity suggesting a common role of oxidative stress. This result provides useful input and a promising therapeutic strategy for CMT2K associated to *GDAP1* mutations.

Keywords : Charcot-Marie-Tooth disease – Oxidative stress – Sirtuins – Resveratrol

## Introduction

Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is one of the commonest causes of inherited peripheral neuropathies with a prevalence of about 10-30 per 100,000, depending on the country of origin (Emery, 1991). To date, about thirty genes have been found responsible for CMT (Banchs et al., 2009). Four of these genes encode mitochondrial proteins, i.e. mitofusin 2 (*MFN2*), ganglioside-induced differentiation-associated-protein 1 (*GDAP1*), heat shock protein beta-8 (*HSPB8*), and heat shock protein beta-1 (*HSPB1*). *GDAP1* mutations are described as responsible for CMT4A (Baxter et al., 2002), the most frequent recessive subtype of demyelinating CMT; for AR-CMT2 (Cuesta et al., 2002), the axonal recessive subtype; for CMTRIA (Senderek et al., 2003), the intermediate recessive CMT; and for CMT2K (Cassereau et al., 2009; Chung et al., 2008; Claramunt et al., 2005; Crimella et al., 2010), the rare dominant subtype.

The pathophysiology of CMT2K is not yet fully understood and deleterious factor inducing neuronal cell death is not known. Although *GDAP1* sequence does not suggest any involvement in mitochondrial dynamics, some studies have suggested that *GDAP1* is a regulator of mitochondrial fission (Niemann et al., 2005). Thus, overexpression of *GDAP1* results in mitochondrial fragmentation whereas silencing *GDAP1* expression results in less fragmented and more elongated mitochondria (Niemann et al., 2005). In neuroblastoma N1E-115 cell line infected with lentiviral particles encoding shRNA against *GDAP1*, additional transfection with a wild-type *GDAP1* expression construct reverted the change in mitochondrial morphology to the situation in control cells. In such KO *GDAP1* cell, re-expression of dominantly inherited *GDAP1* mutants caused significant mitochondrial fragmentation (Niemann et al., 2009), leads to elevated reactive oxygen species (ROS) levels and increases the susceptibility to apoptosis.

These useful models of CMT2K pathologies were confronted to studies from skin fibroblasts from patients harbouring heterozygous mutant alleles at native expression levels, thereby avoiding drastic phenotypes caused by protein overexpression, inactivation or transfection.

We have thus shown that GDAP1:p.C240Y mutation is associated with mitochondrial complex I defect (Cassereau et al., 2009) implying GDAP1 in mitochondrial bioenergetics.

The complex I deficiency is the most common enzymatic deficiency of the oxidative phosphorylation (OXPHOS) system (Smeitink and van den Heuvel, 1999; Triepels et al., 2001) and is associated with a large spectrum of diseases from Leigh syndrome, Leber's hereditary optic neuropathy, mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS syndrome) to other devastating neurodegenerative disorders, including Parkinson's disease (PD) (Schapira et al., 1990). Complex I deficiency leads to reduce NADH oxidation and decreases electron transfer, causing a sharp reduction of mitochondrial ATP production. Evidence has been provided that OXPHOS-derived ROS predominantly originate from reduced flavin in complex I (Kussmaul and Hirst, 2006) and complex I deficiencies may lead to overproduction of ROS. In addition, ROS has a harmful effect on respiratory chain complex I by inducing protein oxidation leading to a decrease of enzymatic activities (Fridovich, 1997).

In the present study, using skin fibroblasts from CMT2K patients from two unrelated families, we investigated the metabolic consequences of GDAP1 mutations targeting or outside GST domains.

## Methods

### Cell culture.

Primary dermal fibroblasts were obtained from skin biopsies taken after getting written consent from 6 control subjects, 3 patients harbouring the p.C240Y and 3 patients carrying the p.R120W mutations in *GDAP1* gene. Fibroblasts were maintained in DMEM/10% bovine calf serum (BCS) at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. All fibroblast cultures were mycoplasma-free, as shown by the DAPI/Hoechst in situ coloration and by PCR (Venor®Gem, BioValley, Marne-la-Vallée, France). All experiments were carried out using cells with similar passage number, ranging from 5 to 15, so as to avoid artefacts due to senescence, i.e. at passage numbers >20.

For experiments using resveratrol, vehicle control (ethanol 1:2500) and resveratrol 10µM, 25 µM or 50 µM (Sigma Chemicals St Louis, MO) were added 48 hours before measurements. Resveratrol 50 µM was not used in complex I activity analysis since an antiproliferative effect was observed with this concentration in control and CMT2K fibroblasts (data not shown)

### mtDNA sequencing :

To exclude the presence of any mitochondrial DNA mutation, we sequenced entirely the mitochondrial genome. The mtDNA was PCR amplified in eight fragments and PCR products were purified and sequenced as described elsewhere (Nochez et al., 2009). One patient harbouring the p.C240Y and one patient carrying the p.R120W mutation have been whole sequenced for their mtDNA.

## **Measurement of respiration rate and efficiency of Mitochondrial ATP Production in Permeabilized Cells**

Respiration rates were determined in cells permeabilized by digitonin exposure (15 µg/million of cells). Cells were resuspended in the respiratory buffer (10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300 mM mannitol, 10 mM KCl and 5 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7.4). The respiratory rates of 3-5\*10<sup>6</sup> cells were recorded at 37°C in 1.5 ml glass chambers using a two-channel, high-resolution Oxygraph respirometer (Oroboros, Innsbruck, Austria). Respiration was started with complex I-dependent substrates (5 mM malate / 5 mM pyruvate). Complex I-coupled state 3 respiration was measured by adding 0.5 mM NAD<sup>+</sup> / 1.5 mM ADP. Then, 10 mM succinate was added to reach maximal coupled respiration and 10 µM rotenone were injected to obtain the complex II-coupled state 3 respiration. Oligomycin (8 µg/ml) was added to determine the uncoupled state 4 respiration. Finally, FCCP (1 µM) was added to control the permeabilisation of fibroblasts.

The rate of mitochondrial ATP synthesis and the ATP/O ratio were determined in cells permeabilized by digitonin exposure as previously described (Loiseau et al., 2007).

### **Enzymatic Activities.**

The activities of the mitochondrial OXPHOS complexes were measured on cell homogenates using a Beckman DU 640 spectrophotometer (Beckman coulter, Fullerton, CA, USA) using an adaptation of the method described by Rustin et al. (1994) with slight modifications. Complex I (NADH ubiquinone reductase) activity was measured according to a procedure previously described (Loiseau et al., 2007) and adapted from Benit et al. (2008) with use of DCPIP. Aconitase and fumarase activities were determined as described elsewhere (Razmara et al., 2008). Isocitrate Deshydrogenase activity was measured by following NADH appearance using 0.8 mM NAD<sup>+</sup> and NADP<sup>+</sup> and 10 mM isocitrate as substrates in a mixture

containing 2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA and 10 mM MgCl<sub>2</sub>, in 50 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer pH 7.5.

#### **Lactate and pyruvate concentrations in cell supernatant.**

Lactate concentrations in the culture media were determined by spectrophotometry, using enzymatic assays (Boehringer, Mannheim, Germany) on a Hitachi-Roche apparatus (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany). Pyruvate concentration was determined by measuring NADH concentration decrease in presence of the lactate dehydrogenase enzyme using DiaSys enzymatic kit (DiaSys, Germany).

#### **Determination of membrane protein thiol content**

The mitochondrial suspension, incubated in standard reaction medium, was submitted to two subsequent freeze-thawing procedures to release matrix proteins and was then centrifuged during 2 min at 16 000 rpm. The pellet was treated with 200µl of 6% trichloroacetic acid and centrifuged at 16 000 rpm during 2 min in order to precipitate the protein. The final pellet was suspended in 200 µl of a medium containing 5 mM EDTA, antiprotease and 0.1% triton, and 1 to 2 µl of 5M KOH were added to neutralized. 50 µl of protein were added to 950 µl of a solution containing 5,5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)(DTNB) 1mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1 M (pH 7.2) and 1 mM EDTA. Solution was incubated 15 min to 37°C before measurement. Absorption was measured at 412 nm.

#### **Western-blotting.**

Isolated mitochondria were extracted from fibroblasts according to the protocol indicated by Mitosciences (<http://www.mitosciences.com/protocols.html>). Mitochondrial proteins (20 µg) were boiled in a Laemmli buffer and analyzed by Western blotting using anti-voltage-

dependent anion channel (VDAC), antitotal OXPHOS complex cocktail (1:500 Mitosciences, Eugene, Oregon), anti-SIRT1 (1:1000 Cell Signaling technology), anti-SIRT3 (1:1000 Cell Signaling technology), anti-MnSOD (1:1000 Abcam, Paris, France), anti-alpha-Tubulin (1:10 000 Sigma, St Louis, MO, USA). Membranes were then washed three times in TBS-Tween 0.1% and incubated with anti-mouse IgG horseradish peroxidase linked antibody (1:20 000 Amersham Biosciences, UK) or with goat anti-rabbit HRP conjugate (1:20 000 Bio-Rad) for 1h at room temperature. The immunoreactive proteins were visualized with enhanced chemiluminescence (ECL+ Western Blotting Detection Reagents, Amersham Biosciences, UK). Band intensities were quantified with Quantity One software (Bio-Rad).

### **Blue native polyacrylamide gel electrophoresis of complex I**

Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) was performed following Wittig et al. (2006). Antibodies anti-NDUFA6, anti-NDUFS3 and anti-NDUFA9 were purchased from MitoSciences.

### **Deconvolution microscopy: mitochondrial network analysis and intracellular ROS detection**

Mitochondria were labelled using Mitotracker® Green (Molecular Probes, CA, USA). Fibroblasts were pulse-loaded with 100nM Mitotracker® Green for 15 min in a humidified atmosphere (95% air, 5% CO<sub>2</sub>) at 37°C. After loading, cells were thoroughly washed with DMEM without red phenol, 1% FCS. For imaging, coverslips were placed on the stage of an inverted microscope. Images were acquired with an inverted wide-field Leica (DMI6000B, Microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with a Roper CoolSnap HQ2 camera (Roper Scientific, Tucson, AZ, USA) a high-sensitivity CCD camera for quantitative fluorescence microscopy. A precision, piezoelectric driver mounted underneath the objective lens allows



faster Z-step movements, keeping the sample immobile while shifting the objective lens. An average of 30 planes images were acquired along the Z-axis at 0.2  $\mu\text{m}$  increments. Metamorph® 7.6 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) were used for image acquisition. We use point-spread function (PSF)-Speck microspheres for testing the optical stability of our system. Image restoration algorithms can be used to reassign the optical blur to its original location (Huygens software, Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands). Each successive iteration leads to a new estimation closer to the real object. At the end of the iterative process, the blur is reduced and the signal considerably increased in the regions of the structures of interest. Imaris 6.3® software (Bitplane, Zurich, Switzerland) for 3D processing and morphometric analysis was used.

To evaluate ROS production, cells were cultured in a four-well chamber slide (Labtek, Nunc International, Naperville, IL). After 48 hours of culture, the culture medium was washed with HBSS, and cells were incubated with MitoSOX™ (5 $\mu\text{M}$ , Molecular Probes) selective mitochondria-targeted specifically for superoxide anion following manufacturer's instructions in HBSS buffer (+CaCl<sub>2</sub> + MgCl<sub>2</sub>) for 15min at 37°C. Images were acquired with with an inverted wide-field Leica (DMI6000B, Microsystems,Wetzlar,Germany) and a Roper CoolSnap HQ2 camera. MetaMorph software (Molecular Devices, CA, USA) was used to analyze images. 30 cells were analyzed per patient. 80 regions of equal size are created; 70 are arranged at the mitochondria most marked and 10 are arranged in the background to evaluate the background noise of the cytosol. The background noise is subtracted from the average intensity of fluorescence to compare qualitatively and quantitatively the production of mitochondrial ROS from controls and patient cells.

## Statistical analysis

Statistical comparisons were made with the Mann-Whitney U test; differences were considered to be significant at  $P < 0.05$ .

## Results

### Mitochondrial complex I deficiency in CMT2K cells.

Mitochondrial bioenergetics studies showed that the mitochondrial NADH ubiquinone oxidoreductase (complex I) enzymatic activity was 50% lower in fibroblasts harbouring the p.C240Y mutation compared to control fibroblasts (figure 1a,  $p=0.01$ ). In patient fibroblasts carrying the p.R120W mutation, complex I activity was 30% reduced compared to controls (Figure 1a,  $p=0.09$ ), but polarography, using complex I substrates, showed that the respiration rate and the corresponding ATP production were 40% lower in both mutated cell lines compared to normal controls (see ATP production value on figure 1b, and malate pyruvate (MP) complex I substrates value on figure 1c, and,  $p<0.05$ ).

### Cytoplasmic redox potential Alteration and Sirtuin 1 reduction in CMT2K fibroblasts

The lactate/pyruvate concentration ratio (L/P) in the culture media of patient's fibroblasts was two to three times higher than in controls cells (figure 2a). This generally indicates a glycolytic switch secondary to mitochondrial dysfunction. The L/P ratio reflects the cytosolic  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ratio by the following relationship:  $\text{lactate} + \text{NAD}^+ \rightarrow \text{pyruvate} + \text{NADH}$ . This cellular  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  concentration ratio (Fulco et al., 2003) is a main factor regulating the  $\text{NAD}^+$ -dependent deacetylase family of Sirtuins. SIRT1 isoform, mainly located in nuclear and cytosolic compartments, has been recognized to have a primary role in mitochondrial biogenesis and metabolism (Aquilano et al., 2010; Gerhart-Hines et al., 2007). The SIRT3

isoform, which is considered as the main mitochondrial NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase, should be involved in regulation of complex I activity (Ahn et al., 2008). We here show, by Western-blotting analysis, that SIRT1 level was almost 70% decreased in CMT2K cells (figure 2b,  $p=0.02$ ) whereas SIRT3 content was unchanged (figure 2c).

### **Complex I deficiency is not due to a reduction or a defective complex I assembly**

Complex I is the largest complex of the respiratory chain being composed of 7 mtDNA and at least 39 nuclear DNA encoded subunits. Mutations in structural subunits have been found in 40% of the patients with inborn deficiency of complex I (Iuso et al., 2006). No pathogenic mutation has been found in CMT2K patients from this study, and haplotype H1 and T have been found for the patient harboring the p.C240Y mutation and the patient harboring the p.R120W mutation respectively (data not shown). By screening several complex I subunits (NDUFB8, NDUFS4, NDUFB6 and NDUFA9) CMT2K fibroblasts extracts, we did not find any modification of complex I content in relation to the complex I enzymatic decreased activity (figure 3a). In addition, no defective complex I assembly have been found by subjecting digitonin-treated mitochondrial extracts to Blue-Native-PAGE analysis followed by NDUFB6, NDUFS3 and NDUFA9 subunits detection (Figure 3b).

### **Krebs cycle is not involved in complex I defect.**

Despite a mitochondrial energetic defect and the energetic glycolytic switch, there was no decrease in mitochondrial mass as shown by the quantification of the citrate synthase activity (Table I). This Krebs cycle enzyme is described as weakly sensitive to Krebs cycle activity as compared to the isocitrate dehydrogenase (ICDH), an important regulated enzyme of Krebs cycle. Because of complex I accepts electrons from the Krebs cycle carrier NADH, we aimed to determine if the ICDH was affected. However, ICDH as well as fumarase, shows no

significant variation (Table 1). Interestingly, in GDAP1:p.C240Y fibroblasts, aconitase activity was strongly decreased by 40% (Table I). This enzyme is specifically sensitive to mitochondrial ROS and the decrease of the ratio aconitase/fumarase is an oxidative stress marker.

### **GDAP1 mutation in GST domain leads to ROS production**

In GDAP1:p.C240Y fibroblasts, the aconitase/fumarase ratio suggested an overproduction of ROS (Table I). By microscopic imaging, using a fluorescent probe specific to mitochondrial oxygen species, we showed a 40% enhancement of fluorescence intensity in GDAP1:p.C240Y fibroblasts compared to controls (Figure 4a and b,  $p=0.020$ ). In addition, the 50% decrease of thiol group level, as compared to control (figure 4c,  $p=0.015$ ), also supported a ROS overproduction. Coherently, the protein expression of the manganese superoxide dismutase (MnSOD), a major mitochondrial antioxidant enzyme, was 53% higher in GDAP1:p.C240Y cells (figure 4d,  $p=0.045$ ). In contrast, with the GDAP1:p.R120W, no oxidative stress marker was observed (figure 4a and b). These results show that the mutation in the GST domain of GDAP1 alone increases the mitochondrial oxidative stress.

### **The antioxidant molecule resveratrol restores the complex I activity in CMT2K.**

Since oxidative stress could be involved in pathophysiology of CMT2K depending on mutation location, we aimed to evaluate the effect of an antioxidant treatment on complex I activity. We chose the resveratrol as a molecule candidate, not only for its very well known antioxidant action, but also for its role in mitochondrial biogenesis via SIRT1 activation (Lagouge et al., 2006). Resveratrol 10 $\mu$ M, 25  $\mu$ M or 50  $\mu$ M were applied 48h on p.C240Y and p.R120W fibroblasts. Whereas resveratrol treatment did not have any effect on complex I activity in control fibroblasts, the complex I activity increased by 44% with resveratrol 25  $\mu$ M

(figure 5,  $p=0.021$ ) in CMT2K fibroblasts, without difference between both mutations. Resveratrol 10  $\mu$ M did not increase complex I activity (data not shown).

### **Alteration of mitochondrial network is dependent on dominant GDAP1 mutations location.**

As previously shown, the p.C240Y mutation is associated with a partial fragmentation of the mitochondrial network (Figure 6) (Cassereau et al., 2009)). In contrast, no alteration of the mitochondrial network was revealed in GDAP1:p.R120W fibroblasts (Figure 6). These results suggest that the mitochondrial fragmentation observed in GDAP1:p.C240Y fibroblasts could be the consequence of oxidative stress.

### **Discussion**

In a previous study on skin fibroblasts from CMT2K patients, the mutation p.C240Y affecting the Glutathione-S-Transferase domain has been associated with mitochondrial complex I defect (Cassereau et al., 2009). We here detailed a metabolic study of a second family carried the p.R120W which did not affect any particular domain of GDAP1. Our results confirmed the mitochondrial NADH ubiquinone oxidoreductase complex I deficiency in CMT2K with a 40% decrease in ATP production derived from complex I substrates. In both p.C240Y and p.R120W fibroblasts, we found an energetic glycolytic switch associated with an alteration of cellular redox potential coherently with a mitochondrial dysfunction.

Mitochondrial complex I oxidizes NADH, produced predominantly by the Krebs cycle, to regenerate the NADH pool but no alteration of others OXPHOS complexes, nor isocitrate

dehydrogenase, fumarase and citrate synthase enzymes activities, has been found in all CMT2K fibroblasts showing the specificity of complex I involvement.

A new conserved family of NAD-dependent deacetylases that regulate the cell metabolism by the deacetylation of key enzymes, the sirtuins, are known to be dependent on NAD<sup>+</sup>/NADH ratio (Fulco et al., 2003). Our protein expression analysis shows that SIRT1 isoform content was 70% decreased in CMT2K patient cells whereas SIRT3 isoform level was maintained as in control cells. The nuclear and cytosolic isoforms SIRT1 have been recognized to have a primary role in mitochondrial metabolism increasing mitochondrial biogenesis through the activation of PPARgamma coactivator-1alpha (PGC1  $\alpha$ ) and nuclear respiratory factor 1 (NRF1) regulatory pathway (Pfluger et al., 2008). However, despite SIRT1 down regulation, no modification of mitochondrial mass was observed in CMT2K fibroblasts, nor down expression of complex I protein subunits as compared to controls.

As regard to literature, SIRT3 was a good candidate to be misregulated in CMT2K. SIRT3 may physically interact with NDUFA9 subunit of complex I and in the absence of SIRT3, multiple components of complex I demonstrate increased acetylation and complex I activity inhibition (Ahn et al., 2008). However, Sirtuins isoforms, whose functionality would be interdependent, would be essentially regulated by the modulation of their enzymatic activity. Modulation of sirtuins deacetylase activity should be performed to precise their function in CMT2K disease. In addition, Sirtuins by their role of deacetylation of histones and transcription factors involved in the regulation of survival pathways, oxidative stress and metabolism (Sauve et al., 2006), are also emerging as potential targets in various neurodegenerative diseases such as Alzheimer or Parkinson's disease.

Moreover, we showed that oxidative stress would be involved in pathogenicity of CMT2K. In a first time, we found elevated oxidative stress markers in GDAP1:p.C240Y fibroblasts, whereas GDAP1:p.R120W cells showed comparable values to control cells. Mitochondrial ROS production and antioxidant MnSOD enzyme were increased in p.C240Y fibroblasts as compared to controls. The p.C240Y mutation affects the Glutathione-S transferase domain of GDAP1. To date, no experimental GDAP1 GST activity has been demonstrated and this result suggests anti-oxidant function of GDAP1. Thus, GSTs are an enzymatic family widely distributed, present both in plants and animals, and play a role in the detoxification of xenobiotics and endogenous toxicants. The primary catalytic activity of GSTs is the conjugation of electrophilic compounds through nucleophilic attack by reduced glutathione. The faulty operation of this process would lead to increase ROS production.

These first results suggest that ROS involvement in pathophysiology of CMT2K depends on mutation location.

Interestingly, 60% of described GDAP1 mutations affect the GST domains suggesting an important role of these domains in GDAP1 function (Cassereau et al., 2011; Crimella et al., 2010). In addition, our synthesis of literature shows that among the dominant forms of the disease, patients carrying mutations located into GST domain had a more rapid disease progression compared to patients carrying the p.R120W mutation, which is the only reported missense mutation involved in CMT2K located outside of a specific domain of the protein (Supplementary data 1). The first symptoms appeared before 10 years in 37.5% of patients carrying mutation in GST domains. In contrast, the first symptoms appeared before 10 years in 5% of patients harboring the p.R120W mutation and 21% of these patients were asymptomatic even after the age of 30.

These observations suggest that the disease progression is more rapid when GST domains are affected, emphasizing the important role of these domains in protein function.

Since oxidative stress seems to be involved in pathophysiology of CMT2K, we aimed to evaluate the effect of an antioxidant treatment on complex I activity. Resveratrol, a polyphenol phytoalexin present in red wine and grapes is well known as an antioxidant by increasing the superoxide dismutase mitochondrial activity and quantity (Robb et al., 2008) and was shown to improve mitochondrial complexes activities during cerebral ischemia (Yousuf et al., 2009).

Interestingly, resveratrol reverts the complex I deficiency in p.C240Y as well as p.R120W. It is well known that complex I is a major mitochondrial site for ROS production (Galkin and Brandt, 2005; Lenaz et al., 2010) and that free radicals has a harmful effect on respiratory chain complex I by inducing protein oxidation leading to a decrease of enzymatic activities (Fridovich, 1997; Ketterer et al., 1988; Zhao et al., 1999). Resveratrol, known to be a sirtuin activator (Borra et al., 2005), could control ROS-induced signalling pathways and increase complex I function by sirtuins dependent deacetylation.

In conclusion, the results emerging from this study provide new evidence for a critical role of mitochondrial dysfunction in the pathogenesis of CMT2K associated to GDAP1 mutations. GDAP1 defect leads to a mitochondrial complex I activity defect associated with an increase ROS production. Mutation in GST domain may limit the antioxidant function of GDAP1 leading to a greater mitochondrial oxidative stress. Finally, this study provides useful input to help in designing a new therapeutic strategy for CMT2K associated to GDAP1 mutation.



## References

- Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, et al. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 14447-52.
- Aquilano K, Vigilanza P, Baldelli S, Pagliei B, Rotilio G, Ciriolo MR. Peroxisome proliferator-activated receptor gamma co-activator 1alpha (PGC-1alpha) and sirtuin 1 (SIRT1) reside in mitochondria: possible direct function in mitochondrial biogenesis. *The Journal of biological chemistry* 2010; 285: 21590-9.
- Banchs I, Casanovas C, Alberti A, De Jorge L, Povedano M, Montero J, et al. Diagnosis of Charcot-Marie-Tooth disease. *J Biomed Biotechnol* 2009; 2009: 985415.
- Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, Stajich JE, Hulette C, Dew-Knight S, et al. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 2002; 30: 21-2.
- Benit P, Slama A, Rustin P. Decylubiquinol impedes mitochondrial respiratory chain complex I activity. *Mol Cell Biochem* 2008; 314: 45-50.
- Borra MT, Smith BC, Denu JM. Mechanism of human SIRT1 activation by resveratrol. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280: 17187-95.
- Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, Desquret V, Verny C, Nicolas G, et al. Mitochondrial dysfunction and pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease involving GDAP1 mutations. *Experimental neurology* 2011; 227: 31-41.
- Cassereau J, Chevrollier A, Gueguen N, Malinge MC, Letournel F, Nicolas G, et al. Mitochondrial complex I deficiency in GDAP1-related autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease (CMT2K). *Neurogenetics* 2009; 10: 145-50.
- Chung KW, Kim SM, Sunwoo IN, Cho SY, Hwang SJ, Kim J, et al. A novel GDAP1 Q218E mutation in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Hum Genet* 2008; 53: 360-4.
- Claramunt R, Pedrola L, Sevilla T, Lopez de Munain A, Berciano J, Cuesta A, et al. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet* 2005; 42: 358-65.
- Crimella C, Tonelli A, Airoidi G, Baschiroto C, D'Angelo MG, Bonato S, et al. The GST domain of GDAP1 is a frequent target of mutations in the dominant form of axonal Charcot Marie Tooth type 2K. *J Med Genet* 2010; 47: 712-6.
- Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, Garcia-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, et al. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 2002; 30: 22-5.
- Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991; 1: 19-29.
- Fridovich I. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997; 272: 18515-7.
- Fulco M, Schiltz RL, Iezzi S, King MT, Zhao P, Kashiwaya Y, et al. Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Molecular cell* 2003; 12: 51-62.
- Galkin A, Brandt U. Superoxide radical formation by pure complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica*. *The Journal of biological chemistry* 2005; 280: 30129-35.

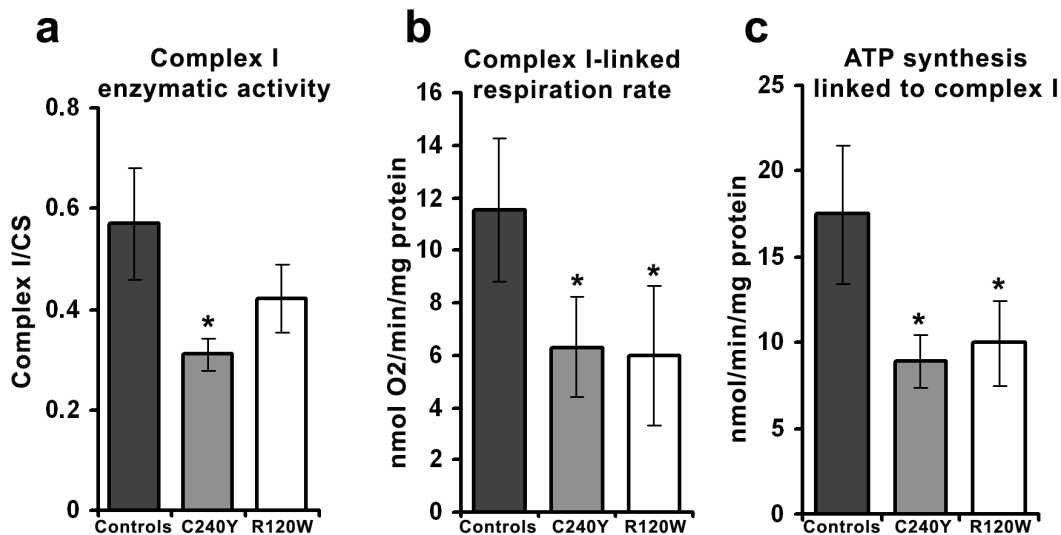
- Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1 $\alpha$ . *Embo J* 2007; 26: 1913-23.
- Iuso A, Scacco S, Piccoli C, Bellomo F, Petruzzella V, Trentadue R, et al. Dysfunctions of cellular oxidative metabolism in patients with mutations in the NDUFS1 and NDUFS4 genes of complex I. *The Journal of biological chemistry* 2006; 281: 10374-80.
- Ketterer B, Meyer DJ, Tan KH. The role of glutathione transferase in the detoxication and repair of lipid and DNA hydroperoxides. *Basic Life Sci* 1988; 49: 669-74.
- Kussmaul L, Hirst J. The mechanism of superoxide production by NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from bovine heart mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2006; 103: 7607-12.
- Lenaz G, Baracca A, Barbero G, Bergamini C, Dalmonte ME, Del Sole M, et al. Mitochondrial respiratory chain super-complex I-III in physiology and pathology. *Biochimica et biophysica acta* 2010; 1797: 633-40.
- Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, Guillet V, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, et al. Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* 2007; 61: 315-23.
- Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 2005; 170: 1067-78.
- Niemann A, Wagner KM, Ruegg M, Suter U. GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol Dis* 2009; 36: 509-20.
- Nochez Y, Arsene S, Gueguen N, Chevrollier A, Ferre M, Guillet V, et al. Acute and late-onset optic atrophy due to a novel OPA1 mutation leading to a mitochondrial coupling defect. *Molecular vision* 2009; 15: 598-608.
- Pfluger PT, Herranz D, Velasco-Miguel S, Serrano M, Tschop MH. Sirt1 protects against high-fat diet-induced metabolic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 9793-8.
- Razmara A, Sunday L, Stirone C, Wang XB, Krause DN, Duckles SP, et al. Mitochondrial effects of estrogen are mediated by estrogen receptor alpha in brain endothelial cells. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2008; 325: 782-90.
- Robb EL, Page MM, Wiens BE, Stuart JA. Molecular mechanisms of oxidative stress resistance induced by resveratrol: Specific and progressive induction of MnSOD. *Biochemical and biophysical research communications* 2008; 367: 406-12.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1994; 228: 35-51.
- Sauve AA, Wolberger C, Schramm VL, Boeke JD. The biochemistry of sirtuins. *Annu Rev Biochem* 2006; 75: 435-65.
- Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Clark JB, Jenner P, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem* 1990; 54: 823-7.
- Senderek J, Bergmann C, Ramaekers VT, Nelis E, Bernert G, Makowski A, et al. Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain* 2003; 126: 642-9.
- Smeitink J, van den Heuvel L. Human mitochondrial complex I in health and disease. *Am J Hum Genet* 1999; 64: 1505-10.
- Triepels RH, Van Den Heuvel LP, Trijbels JM, Smeitink JA. Respiratory chain complex I deficiency. *Am J Med Genet* 2001; 106: 37-45.
- Wittig I, Braun HP, Schagger H. Blue native PAGE. *Nature protocols* 2006; 1: 418-28.

- Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Hoda N, Ishrat T, Khan B, et al. Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res* 2009; 1250: 242-53.
- Zhao T, Singhal SS, Piper JT, Cheng J, Pandya U, Clark-Wronski J, et al. The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 1999; 367: 216-24.

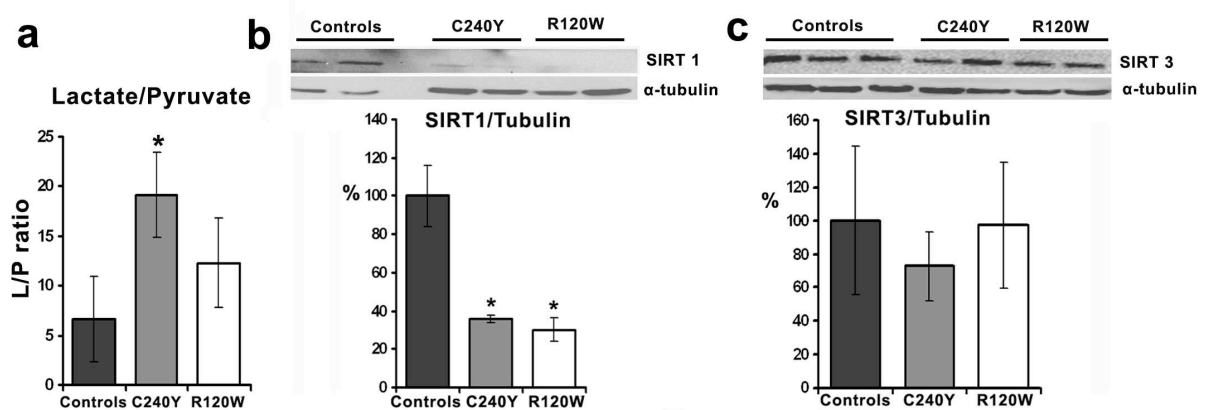
## Figures

**Table I: Krebs cycle enzymes activities.** Enzymatic activities were measured on six controls and on GDAP1 mutant fibroblasts. Aconitase/fumarase ratio was performed as an usual marker of oxidative stress. Isocitrate dehydrogenase (ICDH) activity is normalized with the citrate synthase (CS) activity, a Krebs cycle enzyme weakly sensitive to Krebs cycle activity as compared to ICDH, and used as a reference mitochondrial content.

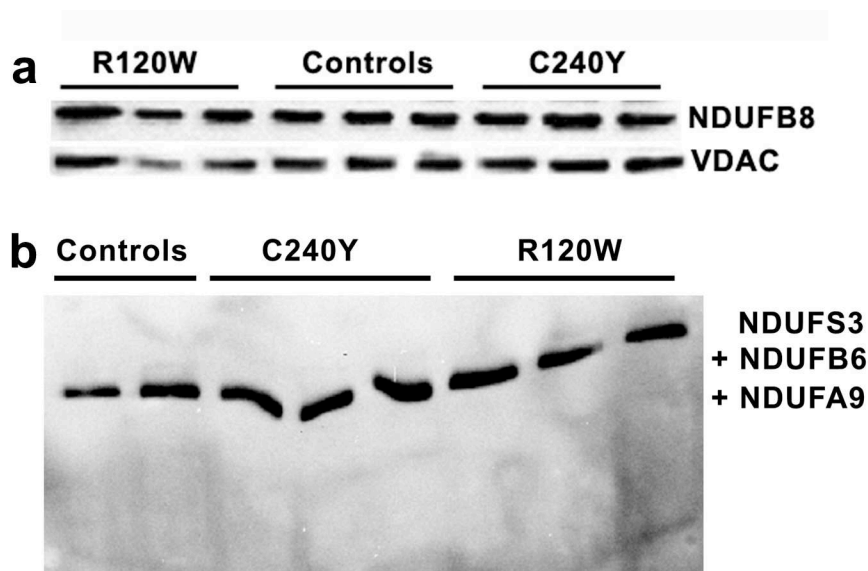
	Controls	C240Y	R120W
Citrate synthase (CS) activity (nmol/min/mg protein)	353 ± 67	404 ± 74	451 ± 44
Aconitase (nmol/min/mg protein)	10.48 ± 1.5	6.38 ± 0.9 *	8.65 ± 1.8
Fumarase (nmol/min/mg protein)	8.0 ± 2.2	6.81 ± 0.5	5.63 ± 0.63
Aconitase/Fumarase	1.37 ± 0.33	0.93 ± 0.07 *	1.53 ± 0.15
ICDH /CS	0.20 ± 0.03	0.23 ± 0.04	0.26 ± 0.09



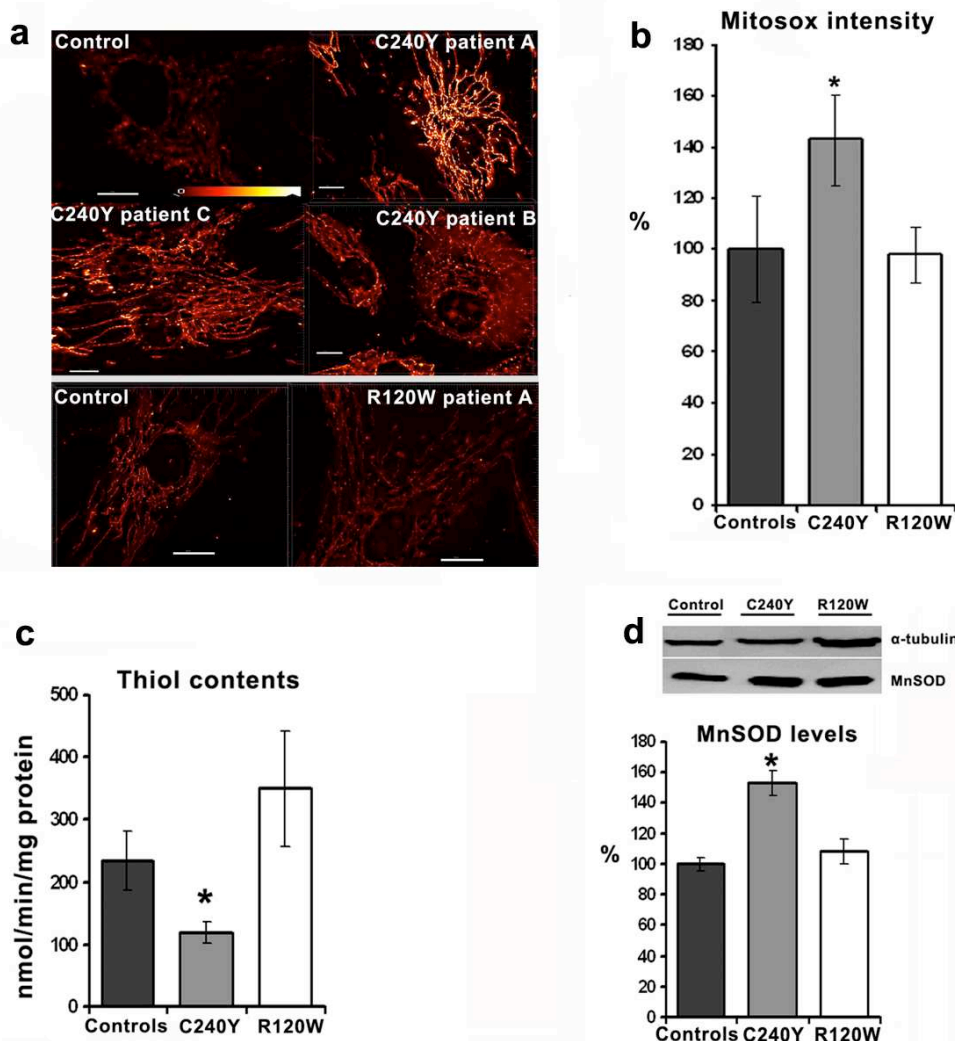
**Figure 1 : Biochemical findings.** a. Complex I enzymatic activity normalized with the citrate synthase (CS) activity, a reference mitochondrial content. b. Rate of oxygen consumption with complex I substrates (Malate and Pyruvate). c. Mitochondrial ATP production with complex I substrates. The results are expressed as mean values ± standard deviations of three independent measurements. Statistical significance levels: \*p<0.05



**Figure 2: Cytosolic redox potential status and sirtuin contents.** **a.** Lactate/Pyruvate (L/P) ratio performed in the culture media of control and patient's fibroblasts, reflecting the cytosolic  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  ratio. **b.** Expression of SIRT1 in fibroblasts of controls and patients analyzed by western-blotting. **c.** Expression of SIRT3 in fibroblasts of controls and patients analyzed by western-blotting. For western-blotting analysis,  $\alpha$ -tubulin is used as marker of protein loading. Values of SIRT/tubulin are expressed as percentage of control values. The results are expressed as mean values  $\pm$  standard deviations of three independent experimentations. Statistical significance levels: \* $p < 0.05$

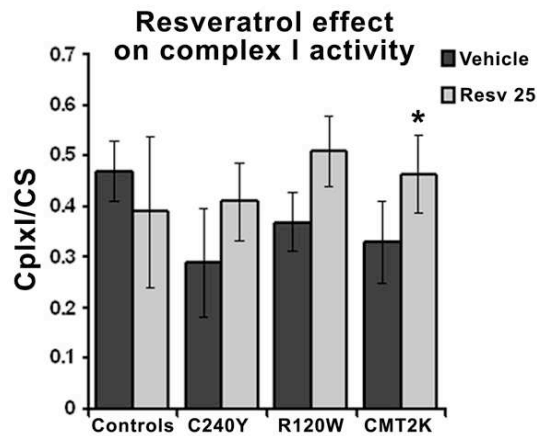


**Figure 3 : Complex I assembly analysis.** **a.** Expression of complex I analyzed by western-blotting using antibodies against subunit NDUFB8 and VDAC, used as a mitochondrial marker. Representative blots for three controls and the six patients are shown. **b.** Complex I assembly analysis blue Native page using antibodies against NDUF3, NDUF6, NDUF9 subunits.



**Figure 4 : Evaluation of ROS production. a.** Fluorescence microscopic imaging, using a fluorescent probe specific to mitochondrial oxygen species (MitoSOX™). The figure illustrates representative images for controls compared to fibroblasts harboring the p.C240Y or the p.R120W mutation. **b.** Histogram representing fluorescence intensity in control fibroblasts compared to patient fibroblasts. Values are expressed as percentage of control values. **c.** Determination of membrane protein thiol content in control fibroblasts compared to mutant fibroblasts. **d.** Expression of MnSOD in fibroblasts of controls and patients analyzed by western-blotting, using  $\alpha$ -tubulin as marker of protein loading. Values of MnSOD/tubulin are expressed as percentage of control values.

Results are expressed as mean values obtained in three controls, in patients harboring the p.C240Y mutations and in patients harboring the p.R120W  $\pm$  standard deviations of three independent experimentations. Statistical significance levels: \* $p < 0.05$



**Figure 5: Effect of resveratrol 25  $\mu$ M on complex I activity.** Complex I enzymatic activity is normalized with the citrate synthase (CS) activity, a reference mitochondrial content. Vehicle corresponds to ethanol at a 1:2500 dilution. The results are expressed as mean values obtained in four controls, in two cell lines harbouring the p.C240Y mutation and in two cell lines harbouring the p.R120W mutation  $\pm$  standard deviations of three independent measurements. Statistical significance levels: \* $p < 0.05$

**Table S1 :** CMT2K patients reported in literature harboring missense mutations in GST domains or in a non-specific domain. To date, the p.R120W is the only described missense mutation associated with CMT2K located outside of a specific domain

GDAP1 mutations	Age of onset (years)	Age at last examination (years)	Walking ability (age of dependance)	References
<i>Mutations affecting GST domains</i>				
Patient 1 S34C	7	20	WS (17 y)	Crimella et al. (2010)
Patient 2 Q218E	16	36	WI	Chung et al. (2008)
Patient 3 Q218E	25	68	WI	Chung et al. (2008)
Patient 4 R226S	8	25	WI	Crimella et al. (2010)
Patient 5 R226S	35	49	WI	Crimella et al. (2010)
Patient 6 C240Y *	30	52	WB (50 y)	Cassereau et al.(2009)
Patient 7 C240Y *	50	78	WI	Cassereau et al.(2009)
Patient 8 C240Y *	10	67	WS (65 y)	Cassereau et al.(2009)
<i>R120W mutation</i>				
Patient 1	14	34	WI	Claramunt et al. (2005)
Patient 2	40	67	WB (65 years)	Sivera et al. (2010)
Patient 3	9	43	WI	Sivera et al. (2010)
Patient 4	asymptomatic	40	WI	Sivera et al. (2010)
Patient 5	35	38	WI	Sivera et al. (2010)
Patient 6	65	80	WI	Sivera et al. (2010)
Patient 7	15	52	WI	Sivera et al. (2010)
Patient 8	asymptomatic	20	WI	Sivera et al. (2010)
Patient 9	16	40	WI	Sivera et al. (2010)
Patient 10	17	38	WI	Sivera et al. (2010)
Patient 11	18	62	WI	Sivera et al. (2010)
Patient 12	20	33	WI	Sivera et al. (2010)
Patient 13	14	30	WI	Sivera et al. (2010)
Patient 14	12	24	WI	Sivera et al. (2010)
Patient 15	asymptomatic	72	WI	Sivera et al. (2010)
Patient 16	25	75	WS (70 years)	Sivera et al. (2010)
Patient 17 *	asymptomatic	62	WI	this study
Patient 18 *	50	65	WI	this study
Patient 19 *	15	68	WI	this study

### IV.3. Résultats et discussion

#### - Altération de la bioénergétique mitochondriale impliquant le complexe I dans le CMT2K

La mesure des paramètres respiratoires et des activités enzymatiques des différents complexes de la chaîne respiratoire a permis de confirmer l'implication de GDAP1 dans la bioénergétique mitochondriale *via* le complexe I. En effet, chez tous les patients étudiés il a été retrouvé un déficit du complexe I associé à une diminution de la synthèse d'ATP sous la dépendance de ce complexe. Cette dysfonction de la chaîne respiratoire a pour conséquence un switch du métabolisme oxydatif mitochondrial aérobie vers une glycolyse aérobie, évalué par le rapport Lactate/Pyruvate (L/P). En effet, le rapport L/P est un témoin fiable du potentiel redox cytosolique ( $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ). Lorsque l'oxydation phosphorylante mitochondriale est bloquée, des équivalents réduits de type NADH s'accumulent et favorisent la formation de lactate de façon à régénérer le NAD pour permettre le fonctionnement de la glycolyse et la production d'ATP à partir du glucose. Chez tous les patients ce rapport  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  est augmenté confirmant l'augmentation de la glycolyse.

Un changement du ratio  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  peut modifier l'activité des sirtuines déacétylases NAD-dépendantes (Canto et al., 2009). Le fonctionnement des sirtuines est dépendant du  $\text{NAD}^+$  et est directement liée au statut énergétique cellulaire (Bitterman et al., 2002; Lin et al., 2000; Lin et al., 2002). Nous avons étudié l'implication de la voie sirtuine-dépendante par quantification des 2 isoformes principales SIRT3 et SIRT1. Nous avons mis en évidence une importante diminution de la quantité de SIRT1 dans les fibroblastes des patients CMT2K probablement secondaire à la modification du potentiel redox. La quantité de SIRT3 est inchangée.

#### - Absence d'anomalie structurale du complexe I.

Nous avons quantifié le complexe I par Western-blot et nous avons analysé l'assemblage des différentes sous-unités par BN-Page. Les différentes analyses n'ont pas montré d'anomalie de la structure du complexe I, confirmant l'hypothèse d'une dérégulation enzymatique du complexe I.



- Implication du stress oxydant dans la physiopathologie du CMT2K.

Notre étude confirme qu'il existe une surproduction de ROS dans les fibroblastes des patients porteurs de la mutation p.C240Y localisée dans le domaine GST-C. En revanche, les fibroblastes des patients porteurs de la mutation p.R120W, n'affectant aucun domaine spécifique de la protéine, n'ont pas de marqueur de stress oxydatif. Cependant, le traitement des fibroblastes des patients par le resvératrol, un antioxydant et activateur de sirtuines, a permis une restauration de l'activité enzymatique du complexe I chez tous les patients. Les ROS semblent ainsi impliqués dans le déficit OXPHOS mitochondrial lié aux mutations de GDAP1. L'absence de signe de stress oxydant dans la famille qui porte la mutation p.R120W pourrait être la conséquence d'une meilleure réponse antioxydante. En effet, il a été mis en évidence une augmentation du stress oxydatif après surexpression de mutations dominantes (p.R120W et p.T157P) dans des cellules HeLa (Niemann et al., 2009). Ces données soulignent l'importance des domaines GST dans la fonction de GDAP1 et suggèrent une implication de la protéine dans les défenses antioxydantes. Cette observation est à corrélérer avec le fait que les mutations qui affectent les domaines GST de la protéine, ont un phénotype clinique plus sévère.

Les résultats de cette étude apportent de nouvelles données dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de cette maladie, impliquant le stress oxydatif en particulier dans les formes affectant des domaines GST où il semble que les capacités de défense contre les ROS soient dépassées. La mise en évidence d'une diminution quantitative de SIRT1, probablement secondaire à un déséquilibre du statut redox, suggère un défaut de régulation à l'origine du déficit du complexe I. Le complexe I est très régulé notamment par des mécanismes de phosphorylation impliquant de nombreuses kinases, et par déacétylation impliquant les sirtuines. Dans le foie de souris SIRT3<sup>-/-</sup>, il a été montré que l'acétylation du complexe I de la chaîne respiratoire est augmentée et associée à une diminution de la consommation d'oxygène mitochondriale avec des substrats du complexe I suggérant ainsi que SIRT3 est impliquée dans la régulation du fonctionnement mitochondrial *via* la déacétylation du complexe I (Ahn et al., 2008). L'exploration de ces mécanismes de régulation par la réalisation d'immunocaptures du complexe I est actuellement en cours afin d'évaluer le niveau d'acétylation et de phosphorylation de ce complexe dans les fibroblastes de patients CMT2K comparés aux contrôles.

L'action du resvératrol ouvre des perspectives thérapeutiques dans cette maladie. Il serait intéressant de vérifier si le resvératrol améliore également les paramètres fonctionnels en oxygraphie et d'étudier l'effet du resvératrol sur la cascade d'activation des sirtuines.

*CONCLUSION GENERALE ET  
PERSPECTIVES*

Les maladies neurodégénératives sont des pathologies dont l'expression phénotypique est extrêmement variée et l'origine moléculaire complexe. Les maladies de Charcot-Marie-Tooth forment une famille de neuropathies héréditaires impliquant plusieurs dizaines de gènes différents. Depuis une dizaine d'années, de nouveaux gènes codant pour des protéines mitochondriales ont été directement liés à des sous-classes de CMT. Les mutations du gène *MFN2*, une protéine impliquée dans le processus de fusion des mitochondries sont ainsi responsables du CMT2A. Le rôle de *MFN2* a été largement étudié par différentes approches moléculaires, cellulaires et par la création de modèles murins. Ces études sont très instructives car elles couvrent une quantité importante d'approches et d'hypothèses. Bien qu'il n'y ait pas encore d'explication physiopathologique claire du CMT2A, plusieurs dysfonctionnements mitochondriaux conduisent à la dégénérescence des neurones. L'altération de la morphologie mitochondriale associée à un défaut de transport des mitochondries ou un défaut de bioénergétique mitochondriale sont en cause.

#### **Modèle fibroblastique CMT2K/4A :**

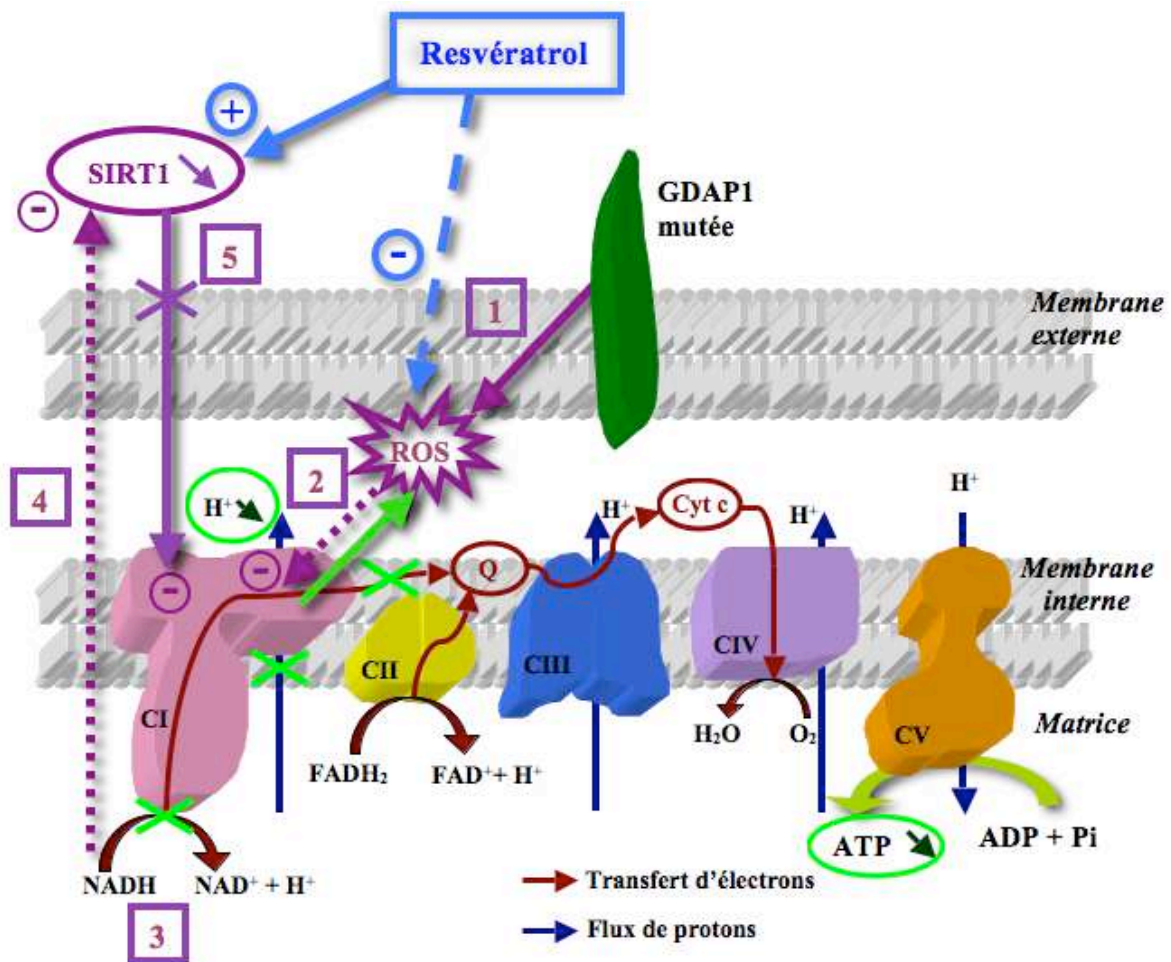
Les études du gène *GDAP1* et du CMT4A/2K sont comparativement très peu nombreuses ce qui limite les hypothèses physiopathologiques. La mise en évidence de mutations du gène *GDAP1* dans une famille suivie à Angers, nous a permis de proposer une étude physiopathologique du CMT2K. C'est avec l'étude métabolique des fibroblastes de peau de ces patients que j'ai initié mes travaux de recherche scientifique. Ce modèle cellulaire est une opportunité très intéressante d'étudier les conséquences de mutations en condition d'expression basale (sans système de transfection, ni mutagenèse). Bien sûr, certaines limites méthodologiques existent et la tissu-spécificité neuronale de ces pathologies est à prendre en considération dans nos hypothèses et nos conclusions. Les fibroblastes restent un modèle d'étude largement utilisé dans le cadre des pathologies mitochondriales.

Malgré la rareté des CMT4A/2K et la complexité à obtenir les biopsies de peau de ces patients, nous avons étudié plusieurs mutations du gène *GDAP1*. Pour cela nous avons collaboré avec une équipe espagnole de l'hôpital de Barcelone, et une équipe du CHU de Bordeaux.

Nous avons exploré la capacité de croissance de ces cellules et étudié leur capacité oxydative par l'analyse de la chaîne respiratoire mitochondriale. Nous avons exploré l'architecture du réseau mitochondrial et l'ultrastructure mitochondriale. Tel que nous l'avons décrit dans nos articles et dans ce manuscrit, nous avons mis en évidence qu'un défaut de

GDAP1 conduit à altérer le métabolisme énergétique mitochondrial. L'activité enzymatique du complexe I est diminuée ainsi que la synthèse d'ATP qui dépend de ce complexe. Le déficit énergétique mitochondrial se traduit par une balance métabolique au profit de la glycolyse. L'expression de SIRT1, une déacétylase NAD<sup>+</sup>-dépendante est profondément diminuée dans ces cellules ce qui montre bien l'altération du rapport NAD<sup>+</sup>/NADH. L'analyse de différents marqueurs du stress oxydatif a montré que la mutation p.C240Y dans un domaine GST (Gluthation-S-Transferase) de GDAP1, conduit à une augmentation importante du stress oxydatif mitochondrial. Ces mêmes marqueurs n'ont pas indiqué de stress oxydant associé à la mutation p.R120W située en dehors de tout domaine de caractéristique connu. Cependant, l'action du resvératrol, une molécule aux propriétés antioxydantes, appliqué aux cultures de fibroblastes, conduit à restaurer l'activité du complexe I des patients CMT2K.

Ces résultats ouvrent de nouvelles perspectives dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques de cette maladie, impliquant non seulement le stress oxydatif mais également la voie des sirtuines, impliquées dans la régulation du complexe I par déacétylation. Le schéma de la figure 12 récapitule les différentes conséquences bioénergétiques des mutations de GDAP1. Nous avons montré l'absence de modification structurale et quantitative des sous-unités du complexe I. Il serait intéressant d'étudier le niveau d'acétylation et de phosphorylation de ce complexe en isolant le complexe I par les techniques d'immunocapture. L'objectif étant à terme de développer des stratégies thérapeutiques ciblant la mitochondrie. Le resvératrol par son action sur la biogenèse mitochondriale *via* SIRT1 en fait une molécule candidate.



**Figure 12: Hypothèses physiopathologiques des mutations du gène GDAP1 sur le métabolisme énergétique de fibroblastes de patients atteints de CMT2K (en violet) et des conséquences du déficit d'activité du complexe I (en vert).**

1 : Les mutations de GDAP1 sont responsables d'une surproduction de ROS dont le niveau varie en fonction de la localisation des mutations.

2 : Les ROS en excès oxydent le complexe I et diminuent son activité. Ce déficit du complexe I est également responsable d'une production accrue de ROS.

3 : Le déficit d'activité du complexe I diminue l'oxydation du NADH, perturbe le transfert d'électrons et le pompage des protons, ce qui aboutit à une diminution de la synthèse d'ATP. Ces altérations provoquent un bascule vers un métabolisme glycolytique ce qui modifie le potentiel redox cytosolique.

4 : La quantité de la protéine SIRT1, une déacétylase NAD<sup>+</sup>-dépendante sensible à l'équilibre redox de la cellule, est diminuée.

5 : La diminution de SIRT1 perturbe la voie des sirtuines, qui sont des enzymes impliquées dans le processus de régulation des différents complexes de la chaîne respiratoire par la modulation du niveau d'acétylation de protéines cibles de ces complexes.

Le resvératrol (en bleu), un antioxydant et activateur de SIRT1, améliore l'activité du complexe I en diminuant les ROS d'une part, et en stimulant le métabolisme mitochondrial et la voie de la biogénèse mitochondriale via les sirtuines d'autre part.

### **Base de données (LSDB) :**

De façon intéressante, nos données fondamentales concernant le domaine GST croisent avec la sévérité des phénotypes des patients porteurs de mutations dans ces domaines. La base de données spécifique de GDAP1 que nous avons construite, montre clairement que les mutations GST sont majoritaires parmi les mutations de GDAP1 et que le phénotype associé à ces mutations est généralement plus sévère avec un début précoce de la maladie et une évolution plus rapide. Cette base de données naissante doit pouvoir apporter un outil décisionnel pour les cliniciens et une base de réflexion pour la recherche de la physiopathologie de la maladie.

### **Génétique moléculaire des CMT :**

L'importance de confronter les données biologiques, moléculaires et cliniques est démontrée par notre étude d'un patient porteur de deux mutations dans les gènes *GDAP1* et *MFN2*. Ce patient est atteint d'une forme très sévère de CMT contrastant avec le phénotype très modéré des autres membres de la famille atteints de CMT. Les études du métabolisme énergétique mitochondrial des fibroblastes de ce patient montrent un effet synergique des mutations associant un découplage mitochondrial lié à la mutation *MFN2* et un déficit d'activité du complexe I lié aux mutations *GDAP1*, responsable d'un effondrement de la synthèse d'ATP. Ces résultats permettent d'expliquer, au moins en partie, la sévérité clinique observée chez ces patients et met l'accent sur l'intérêt d'une enquête génétique approfondie nécessaire au conseil génétique, en particulier dans les familles présentant une forte hétérogénéité phénotypique. De récentes communications affichées suggèrent que cette association de mutations *MFN2/GDAP1* ne serait pas rare (Assises de Génétique, Strasbourg, 2010). Cette coexistence de mutations renforce l'importance d'une coopérativité de *GDAP1* et de *MFN2*. Nous souhaitons déposer un projet afin de poursuivre la collecte de fibroblastes de peau de patients double-mutés dans différents centres de neurologie en France et en Espagne.

Par ailleurs, la perspective de l'analyse de la totalité des exons des gènes ou technologie exome, des patients CMT apportera de nouvelles données sur la compréhension de ces pathologies. Ces données sont essentielles pour expliquer l'importante hétérogénéité intrafamiliale constatée dans certaines formes de CMT. Cette approche est en effet de plus en plus accessible et nous rédigeons un projet dans ce sens.

Par ailleurs, il a été récemment rapporté une nouvelle mutation du gène MFN2 dans une famille présentant un phénotype d'Atrophie Optique Dominante « plus » (Chausseot, Rouzier, communication affichée, JNLF, Paris, 2011). De plus, des délétions multiples de l'ADN mitochondrial ont été retrouvées dans le muscle de ces patients. Ces données impliquent pour la première fois la protéine MFN2 dans la stabilité de l'ADNmt. L'accumulation de délétions multiples est non linéaire, ce qui pourrait expliquer en partie l'hétérogénéité clinique. Nous avons initié un projet clinique-biologique afin de collecter les urines de patients CMT2A. En effet l'urine est un moyen d'accéder à des cellules de tissu post-mitotique potentiellement touché par les délétions multiples de l'ADNmt.

### **Tissu spécificité et modèles neuronaux :**

Tel que nous l'avons abordé ci-dessus, la question de la spécificité tissulaire de ces pathologies reste centrale. La maladie de Charcot-Marie-Tooth est une pathologie touchant le système nerveux périphérique.

Les cellules neuronales ont une morphologie particulière et des dimensions hors normes. Les axones de ces cellules, qui peuvent atteindre jusqu'à un mètre de long, doivent mobiliser une importante quantité d'énergie pour propager l'influx nerveux. Ces transferts d'énergie font intervenir différents acteurs telles que des créatines kinase et phosphocréatines qui participent au flux métabolique jusqu'aux pompes ATP-dépendantes, et/ou qui stockent les liaisons phosphates riches en énergie. Ces cascades métaboliques sont couplées au déplacement des mitochondries le long des axones. Ces migrations antérograde et rétrograde nécessitent également une dépense d'énergie par les moteurs moléculaires qui tractent les mitochondries le long des microtubules. La production d'ATP mitochondriale est en plus indispensable à la transmission synaptique et à la libération des neurotransmetteurs.

Il sera donc nécessaire de développer des lignées neuronales afin d'étudier les conséquences de ces modifications sur la dynamique mitochondriale des neurones, et être ainsi plus proche de la physiopathologie de la maladie. Notre équipe souhaite s'engager dans la génération et la production de cellules souches induites à partir de fibroblastes de patient porteurs de mutations dans des gènes impliqués dans la dynamique et la bioénergétique mitochondriale. Ces cellules souches seront ensuite différenciées en cellules neuronales pour analyser les conséquences des mutations de ces gènes sur la physiopathologie mitochondriale. Il serait alors intéressant d'étudier le transport axonal mitochondrial par vidéomicroscopie dans un modèle neuronal de CMT2K afin de déterminer si une anomalie des mouvements mitochondriaux au sein des axones peut intervenir dans le mécanisme de



neurodégénérescence comme cela a été montré dans le CMT2A2 par mutations du gène *MFN2*. Il serait souhaitable de développer des méthodes de mesure de la vitesse du déplacement des mitochondries dans le laboratoire car cette approche pourrait être élargie à d'autres formes de CMT axonal. En effet, des anomalies du transport axonal semblent impliquées dans un certain nombre de ces CMT. C'est le cas du CMT2A1 lié à des mutations du gène *KIF1B* codant pour la kinésine 1B, un moteur moléculaire impliqué dans le transport axonal (Zhao et al., 2001). Dans le CMT2E par mutations de *NEFL*, le cytosquelette est déstructuré ce qui altère le transport axonal mitochondrial et conduit à une dysfonction mitochondriale (Tradewell et al., 2009). Dans le cas de mutations d'*HSPB1* (small heat-shock protein B1) responsables du CMT2F, il a été mis en évidence un désassemblage des neurofilaments qui perturberait également le transport axonal mitochondrial (Ackerley et al., 2006).

### **Cellules de Schwann :**

L'analyse des paramètres électrophysiologiques concernant les patients répertoriés dans la base de données montre que les formes dites démyélinisantes n'ont pas les caractéristiques habituelles des formes démyélinisantes de CMT affectant les protéines de la myéline. En effet, lorsque les vitesses de conduction nerveuse sont diminuées (en général entre 25 et 35 m/s), les amplitudes sont effondrées très précocement et souvent inférieures à 0,5 mV, suggérant que l'atteinte primitive serait axonale et que la démyélinisation serait secondaire à cette perte axonale majeure. Les données histologiques retrouvent une perte constante des grosses fibres, pouvant expliquer les diminutions des VCM malgré des amplitudes parfois peu diminuées. Les formes de CMT impliquant la protéine GDAP1 semblent donc être des formes axonales avec une démyélinisation secondaire plus ou moins importante en fonction de la sévérité de la maladie et de son stade d'évolution. Il serait nécessaire d'étayer cette hypothèse par des éléments fondamentaux s'appuyant sur des expériences de co-cultures neurones/cellules de Schwann afin de préciser s'il s'agit d'une pathologie de la relation neurone/cellule de Schwann ou s'il existe une atteinte directe de la cellule de Schwann dans certaines de ces formes décrites comme démyélinisantes.

En tant que Neurologue, cet apprentissage et ce travail de recherche scientifique ont été une opportunité incroyable de faire le lien entre le patient, l'observation clinique, la compréhension de la physiopathologie et la démarche thérapeutique.

L'acte médical et la démarche scientifique sont indissociables. Cela me paraît d'autant plus vrai en Neurologie où il est nécessaire de bien connaître les mécanismes physiopathologiques des maladies afin d'informer et de conseiller au mieux les patients. Suite à ces travaux de recherche, je souhaite poursuivre une carrière hospitalo-universitaire dans le service de neurologie du Pr Dubas au CHU d'Angers. Mon activité clinique sera spécialisée dans les neuropathies périphériques et j'envisage de poursuivre mon travail de recherche sur les pathologies neurodégénératives et les perturbations mitochondriales. Ceci s'inscrit dans un programme local du CHU d'Angers où les patients sont recrutés et suivis dans le Centre de Référence National des Pathologies Neurogénétiques et Mitochondriales coordonné par le Pr Bonneau et le Dr Verny, et le travail de recherche sur ces pathologies réalisé par l'équipe de recherche spécialisée dans les pathologies mitochondriales et héréditaires, menée par le Pr Reynier et le Pr Procaccio.

# *BIBLIOGRAPHIE*

- Acin-Perez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernandez-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Perez-Martos A, Bruno C, et al. Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Mol Cell* 2004; 13: 805-15.
- Ackerley S, James PA, Kalli A, French S, Davies KE, Talbot K. A mutation in the small heat-shock protein HSPB1 leading to distal hereditary motor neuronopathy disrupts neurofilament assembly and the axonal transport of specific cellular cargoes. *Human molecular genetics* 2006; 15: 347-54.
- Adams JM, Cory S. Bcl-2-regulated apoptosis: mechanism and therapeutic potential. *Curr Opin Immunol* 2007; 19: 488-96.
- Ahmad KA, Clement MV, Pervaiz S. Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* 2003; 1010: 365-73.
- Ahn BH, Kim HS, Song S, Lee IH, Liu J, Vassilopoulos A, et al. A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105: 14447-52.
- Albani D, Polito L, Batelli S, De Mauro S, Fracasso C, Martelli G, et al. The SIRT1 activator resveratrol protects SK-N-BE cells from oxidative stress and against toxicity caused by alpha-synuclein or amyloid-beta (1-42) peptide. *J Neurochem* 2009; 110: 1445-56.
- Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 2000; 26: 211-5.
- Amati-Bonneau P, Guichet A, Olichon A, Chevrollier A, Viala F, Miot S, et al. OPA1 R445H mutation in optic atrophy associated with sensorineural deafness. *Ann Neurol* 2005; 58: 958-63.
- Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo ME, Bornstein B, Boissiere A, et al. OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* 2008; 131: 338-51.
- Antonicka H, Ogilvie I, Taivassalo T, Anitori RP, Haller RG, Vissing J, et al. Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency. *J Biol Chem* 2003; 278: 43081-8.
- Antonsson B, Montessuit S, Lauper S, Eskes R, Martinou JC. Bax oligomerization is required for channel-forming activity in liposomes and to trigger cytochrome c release from mitochondria. *Biochem J* 2000; 345 Pt 2: 271-8.
- Arnoult D. Mitochondrial fragmentation in apoptosis. *Trends Cell Biol* 2007; 17: 6-12.
- Arnoult D, Grodet A, Lee YJ, Estaquier J, Blackstone C. Release of OPA1 during apoptosis participates in the rapid and complete release of cytochrome c and subsequent mitochondrial fragmentation. *J Biol Chem* 2005a; 280: 35742-50.
- Arnoult D, Rismanchi N, Grodet A, Roberts RG, Seeburg DP, Estaquier J, et al. Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol* 2005b; 15: 2112-8.
- Azzedine H, Ruberg M, Ente D, Gilardeau C, Perie S, Wechsler B, et al. Variability of disease progression in a family with autosomal recessive CMT associated with a S194X and new R310Q mutation in the GDAP1 gene. *Neuromuscul Disord* 2003; 13: 341-6.

- Bach D, Naon D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Rieusset J, et al. Expression of Mfn2, the Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A gene, in human skeletal muscle: effects of type 2 diabetes, obesity, weight loss, and the regulatory role of tumor necrosis factor alpha and interleukin-6. *Diabetes* 2005; 54: 2685-93.
- Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, et al. Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 2003; 278: 17190-7.
- Baloh RH, Schmidt RE, Pestronk A, Milbrandt J. Altered axonal mitochondrial transport in the pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth disease from mitofusin 2 mutations. *J Neurosci* 2007; 27: 422-30.
- Barsoum MJ, Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Kushnareva Y, Graber S, et al. Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *Embo J* 2006; 25: 3900-11.
- Baxter RV, Ben Othmane K, Rochelle JM, Stajich JE, Hulette C, Dew-Knight S, et al. Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat Genet* 2002; 30: 21-2.
- Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of aging matures. *Physiol Rev* 1998; 78: 547-81.
- Ben Othmane K, Hentati F, Lennon F, Ben Hamida C, Blel S, Roses AD, et al. Linkage of a locus (CMT4A) for autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease to chromosome 8q. *Hum Mol Genet* 1993; 2: 1625-8.
- Benard G, Bellance N, James D, Parrone P, Fernandez H, Letellier T, et al. Mitochondrial bioenergetics and structural network organization. *J Cell Sci* 2007; 120: 838-48.
- Bernard R, De Sandre-Giovannoli A, Delague V, Levy N. Molecular genetics of autosomal-recessive axonal Charcot-Marie-Tooth neuropathies. *Neuromolecular Med* 2006; 8: 87-106.
- Birouk N, Azzedine H, Dubourg O, Muriel MP, Benomar A, Hamadouche T, et al. Phenotypical features of a Moroccan family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease associated with the S194X mutation in the GDAP1 gene. *Arch Neurol* 2003; 60: 598-604.
- Birouk N, Gouider R, Le Guern E, Gugenheim M, Tardieu S, Maisonobe T, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 1A with 17p11.2 duplication. Clinical and electrophysiological phenotype study and factors influencing disease severity in 119 cases. *Brain* 1997; 120 ( Pt 5): 813-23.
- Bitterman KJ, Anderson RM, Cohen HY, Latorre-Esteves M, Sinclair DA. Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem* 2002; 277: 45099-107.
- Boaretto F, Vettori A, Casarin A, Vazza G, Muglia M, Rossetto MG, et al. Severe CMT type 2 with fatal encephalopathy associated with a novel MFN2 splicing mutation. *Neurology* 2010; 74: 1919-21.
- Bobyleva V, Bellei M, Paziienza TL, Muscatello U. Effect of cardiolipin on functional properties of isolated rat liver mitochondria. *Biochem Mol Biol Int* 1997; 41: 469-80.
- Boekema EJ, Braun HP. Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *J Biol Chem* 2007; 282: 1-4.

- Bossy-Wetzell E, Barsoum MJ, Godzik A, Schwarzenbacher R, Lipton SA. Mitochondrial fission in apoptosis, neurodegeneration and aging. *Curr Opin Cell Biol* 2003; 15: 706-16.
- Bouche P, Gherardi R, Cathala HP, Lhermitte F, Castaigne P. Peroneal muscular atrophy. Part 1. Clinical and electrophysiological study. *J Neurol Sci* 1983; 61: 389-99.
- Bouhouche A, Benomar A, Birouk N, Mularoni A, Meggouh F, Tassin J, et al. A locus for an axonal form of autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease maps to chromosome 1q21.2-q21.3. *Am J Hum Genet* 1999; 65: 722-7.
- Bouhouche A, Birouk N, Azzedine H, Benomar A, Drosier G, Ente D, et al. Autosomal recessive axonal Charcot-Marie-Tooth disease (ARCMT2): phenotype-genotype correlations in 13 Moroccan families. *Brain* 2007; 130: 1062-75.
- Boveris A, Chance B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen. *Biochem J* 1973; 134: 707-16.
- Bradamante S, Barenghi L, Villa A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. *Cardiovasc Drug Rev* 2004; 22: 169-88.
- Brand MD, Affourtit C, Esteves TC, Green K, Lambert AJ, Miwa S, et al. Mitochondrial superoxide: production, biological effects, and activation of uncoupling proteins. *Free Radic Biol Med* 2004; 37: 755-67.
- Brand MD, Steverding D, Kadenbach B, Stevenson PM, Hafner RP. The mechanism of the increase in mitochondrial proton permeability induced by thyroid hormones. *Eur J Biochem* 1992; 206: 775-81.
- Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC. Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* 2003; 160: 1115-27.
- Canto C, Gerhart-Hines Z, Feige JN, Lagouge M, Noriega L, Milne JC, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD<sup>+</sup> metabolism and SIRT1 activity. *Nature* 2009; 458: 1056-60.
- Carroll J, Fearnley IM, Walker JE. Definition of the mitochondrial proteome by measurement of molecular masses of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 16170-5.
- Cartoni R, Arnaud E, Medard JJ, Poirot O, Courvoisier DS, Chrast R, et al. Expression of mitofusin 2(R94Q) in a transgenic mouse leads to Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Brain* 2010; 133: 1460-9.
- Cartoni R, Leger B, Hock MB, Praz M, Crettenand A, Pich S, et al. Mitofusins 1/2 and ERRalpha expression are increased in human skeletal muscle after physical exercise. *J Physiol* 2005; 567: 349-58.
- Cartoni R, Martinou JC. Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp Neurol* 2009; 218: 268-73.
- Casasnovas C, Banchs I, Cassereau J, Gueguen N, Chevrollier A, Martinez-Matos JA, et al. Phenotypic spectrum of MFN2 mutations in the Spanish population. *Journal of medical genetics* 2010; 47: 249-56.
- Cassereau J, Casasnovas C, Gueguen N, Malinge MC, Guillet V, Reynier P, et al. Simultaneous MFN2 and GDAP1 mutations cause major mitochondrial defects in a patient with CMT. *Neurology* 2011; 76: 1524-6.

- Chance B, Sies H, Boveris A. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol Rev* 1979; 59: 527-605.
- Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. VI. The effects of adenosine diphosphate on azide-treated mitochondria. *J Biol Chem* 1956; 221: 477-89.
- Charcot JM, Marie P. Sur une forme particuliere d'atrophie musculaire progressive, souvent familiale, débutant par les pieds et les jambes et atteignant plus tard les mains. *Revue Médicale (Paris)* 1886; 6: 97-138.
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 2003; 160: 189-200.
- Chen JJ, Bertrand H, Yu BP. Inhibition of adenine nucleotide translocator by lipid peroxidation products. *Free Radic Biol Med* 1995; 19: 583-90.
- Chevrollier A, Guillet V, Loiseau D, Gueguen N, de Crescenzo MA, Verny C, et al. Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol* 2008; 63: 794-8.
- Chung KW, Kim SM, Sunwoo IN, Cho SY, Hwang SJ, Kim J, et al. A novel GDAP1 Q218E mutation in autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *J Hum Genet* 2008; 53: 360-4.
- Cimen H, Han MJ, Yang Y, Tong Q, Koc H, Koc EC. Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry* 2010; 49: 304-11.
- Cipolat S, Martins de Brito O, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 15927-32.
- Claramunt R, Pedrola L, Sevilla T, Lopez de Munain A, Berciano J, Cuesta A, et al. Genetics of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A: mutations, inheritance, phenotypic variability, and founder effect. *J Med Genet* 2005; 42: 358-65.
- Cohn AC, Toomes C, Potter C, Towns KV, Hewitt AW, Inglehearn CF, et al. Autosomal dominant optic atrophy: penetrance and expressivity in patients with OPA1 mutations. *Am J Ophthalmol* 2007; 143: 656-62.
- Crimella C, Tonelli A, Airoidi G, Baschiroto C, D'Angelo MG, Bonato S, et al. The GST domain of GDAP1 is a frequent target of mutations in the dominant form of axonal Charcot Marie Tooth type 2K. *J Med Genet* 2010; 47: 712-6.
- Cruciat CM, Brunner S, Baumann F, Neupert W, Stuart RA. The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem* 2000; 275: 18093-8.
- Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, Garcia-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, et al. The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 2002; 30: 22-5.
- de Brito OM, Scorrano L. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 2008; 456: 605-10.
- De Jonghe P, Timmerman V, Ceuterick C, Nelis E, De Vriendt E, Lofgren A, et al. The Thr124Met mutation in the peripheral myelin protein zero (MPZ) gene is associated with a clinically distinct Charcot-Marie-Tooth phenotype. *Brain* 1999; 122 ( Pt 2): 281-90.

- de la Lastra CA, Villegas I. Resveratrol as an antioxidant and pro-oxidant agent: mechanisms and clinical implications. *Biochem Soc Trans* 2007; 35: 1156-60.
- De Sandre-Giovannoli A, Chaouch M, Kozlov S, Vallat JM, Tazir M, Kassouri N, et al. Homozygous defects in LMNA, encoding lamin A/C nuclear-envelope proteins, cause autosomal recessive axonal neuropathy in human (Charcot-Marie-Tooth disorder type 2) and mouse. *Am J Hum Genet* 2002; 70: 726-36.
- Degli Esposti M. Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1364: 222-35.
- Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, et al. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* 2001; 109: 584-91.
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, et al. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 2000; 26: 207-10.
- Delivani P, Adrain C, Taylor RC, Duriez PJ, Martin SJ. Role for CED-9 and Egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics. *Mol Cell* 2006; 21: 761-73.
- den Dunnen JT, Antonarakis SE. Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Hum Mutat* 2000; 15: 7-12.
- Detmer SA, Vande Velde C, Cleveland DW, Chan DC. Hindlimb gait defects due to motor axon loss and reduced distal muscles in a transgenic mouse model of Charcot-Marie-Tooth type 2A. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 367-75.
- Diot A, Guillou E, Daloyau M, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ, Belenguer P. Transmembrane segments of the dynamin Msp1p uncouple its functions in the control of mitochondrial morphology and genome maintenance. *J Cell Sci* 2009; 122: 2632-9.
- Dubourg O, Azzedine H, Verny C, Durosier G, Birouk N, Gouider R, et al. Autosomal-recessive forms of demyelinating Charcot-Marie-Tooth disease. *Neuromolecular Med* 2006; 8: 75-86.
- Dudkina NV, Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; 102: 3225-9.
- Eiberg H, Kjer B, Kjer P, Rosenberg T. Dominant optic atrophy (OPA1) mapped to chromosome 3q region. I. Linkage analysis. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 977-80.
- Emery AE. Population frequencies of inherited neuromuscular diseases--a world survey. *Neuromuscul Disord* 1991; 1: 19-29.
- Erecinska M, Wilson DF. Regulation of cellular energy metabolism. *J Membr Biol* 1982; 70: 1-14.
- Estaquier J, Arnoult D. Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1086-94.
- Fadeel B, Orrenius S. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med* 2005; 258: 479-517.
- Ferre M, Amati-Bonneau P, Tourmen Y, Malthiery Y, Reynier P. eOPA1: an online database for OPA1 mutations. *Human mutation* 2005; 25: 423-8.



- Ferre M, Bonneau D, Milea D, Chevrollier A, Verny C, Dollfus H, et al. Molecular screening of 980 cases of suspected hereditary optic neuropathy with a report on 77 novel OPA1 mutations. *Hum Mutat* 2009; 30: E692-705.
- Fokkema IF, den Dunnen JT, Taschner PE. LOVD: easy creation of a locus-specific sequence variation database using an "LSDB-in-a-box" approach. *Human mutation* 2005; 26: 63-8.
- Fokkema IF, Taschner PE, Schaafsma GC, Celli J, Laros JF, den Dunnen JT. LOVD v.2.0: the next generation in gene variant databases. *Human mutation* 2011; 32: 557-63.
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, et al. The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 2001; 1: 515-25.
- Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, et al. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 2006; 126: 177-89.
- Fridovich I. Superoxide anion radical (O<sub>2</sub><sup>-</sup>), superoxide dismutases, and related matters. *J Biol Chem* 1997; 272: 18515-7.
- Friedrich T. Complex I: a chimaera of a redox and conformation-driven proton pump? *J Bioenerg Biomembr* 2001; 33: 169-77.
- Frye RA. Characterization of five human cDNAs with homology to the yeast SIR2 gene: Sir2-like proteins (sirtuins) metabolize NAD and may have protein ADP-ribosyltransferase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 273-9.
- Funalot B, Magdelaine C, Sturtz F, Ouvrier R, Vallat JM. [Ultrastructural lesions of axonal mitochondria in patients with childhood-onset Charcot-Marie-Tooth disease due to MFN2 mutations]. *Bull Acad Natl Med* 2009; 193: 151-60; discussion 160-1.
- Gabalton T, Rainey D, Huynen MA. Tracing the evolution of a large protein complex in the eukaryotes, NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J Mol Biol* 2005; 348: 857-70.
- Gegg ME, Cooper JM, Chau KY, Rojo M, Schapira AH, Taanman JW. Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* 2010; 19: 4861-70.
- Gerhart-Hines Z, Rodgers JT, Bare O, Lerin C, Kim SH, Mostoslavsky R, et al. Metabolic control of muscle mitochondrial function and fatty acid oxidation through SIRT1/PGC-1alpha. *Embo J* 2007; 26: 1913-23.
- Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *Embo J* 2005; 24: 1546-56.
- Giraud MF, Paumard P, Soubannier V, Vaillier J, Arselin G, Salin B, et al. Is there a relationship between the supramolecular organization of the mitochondrial ATP synthase and the formation of cristae? *Biochim Biophys Acta* 2002; 1555: 174-80.
- Glater EE, Megeath LJ, Stowers RS, Schwarz TL. Axonal transport of mitochondria requires mltin to recruit kinesin heavy chain and is light chain independent. *J Cell Biol* 2006; 173: 545-57.

- Greene DA, Winegrad AI. In vitro studies of the substrates for energy production and the effects of insulin on glucose utilization in the neural components of peripheral nerve. *Diabetes* 1979; 28: 878-87.
- Griparic L, van der Blik AM. The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic* 2001; 2: 235-44.
- Guillet V, Gueguen N, Verny C, Ferre M, Homedan C, Loiseau D, et al. Adenine nucleotide translocase is involved in a mitochondrial coupling defect in MFN2-related Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Neurogenetics* 2010; 11: 127-33.
- Haigis MC, Mostoslavsky R, Haigis KM, Fahie K, Christodoulou DC, Murphy AJ, et al. SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* 2006; 126: 941-54.
- Hertz L, Drejer J, Schousboe A. Energy metabolism in glutamatergic neurons, GABAergic neurons and astrocytes in primary cultures. *Neurochemical research* 1988; 13: 605-10.
- Hill MM, Adrain C, Duriez PJ, Creagh EM, Martin SJ. Analysis of the composition, assembly kinetics and activity of native Apaf-1 apoptosomes. *Embo J* 2004; 23: 2134-45.
- Hill R.L. BRA. [17] Fumarase. [EC 4.2.1.2 l-Malate hydro-lyase]. *Methods in Enzymology* 1969; 13: 91-99.
- Hojlund K, Wrzesinski K, Larsen PM, Fey SJ, Roepstorff P, Handberg A, et al. Proteome analysis reveals phosphorylation of ATP synthase beta -subunit in human skeletal muscle and proteins with potential roles in type 2 diabetes. *J Biol Chem* 2003; 278: 10436-42.
- Horbinski C, Chu CT. Kinase signaling cascades in the mitochondrion: a matter of life or death. *Free Radic Biol Med* 2005; 38: 2-11.
- Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, et al. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature* 2003; 425: 191-6.
- Imai S, Armstrong CM, Kaeberlein M, Guarente L. Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 2000; 403: 795-800.
- Jaburek M, Varecha M, Gimeno RE, Dembski M, Jezek P, Zhang M, et al. Transport function and regulation of mitochondrial uncoupling proteins 2 and 3. *J Biol Chem* 1999; 274: 26003-7.
- Jackman MR, Willis WT. Characteristics of mitochondria isolated from type I and type IIb skeletal muscle. *The American journal of physiology* 1996; 270: C673-8.
- Jahani-Asl A, Cheung EC, Neuspiel M, MacLaurin JG, Fortin A, Park DS, et al. Mitofusin 2 protects cerebellar granule neurons against injury-induced cell death. *J Biol Chem* 2007; 282: 23788-98.
- James AM, Wei YH, Pang CY, Murphy MP. Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *The Biochemical journal* 1996; 318 ( Pt 2): 401-7.
- Jang M, Cai L, Udeani GO, Slowing KV, Thomas CF, Beecher CW, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science* 1997; 275: 218-20.

- Janssen RJ, Nijtmans LG, van den Heuvel LP, Smeitink JA. Mitochondrial complex I: structure, function and pathology. *J Inher Metab Dis* 2006; 29: 499-515.
- Jonas E. BCL-xL regulates synaptic plasticity. *Molecular interventions* 2006; 6: 208-22.
- Kadenbach B. Intrinsic and extrinsic uncoupling of oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1604: 77-94.
- Karbowski M, Norris KL, Cleland MM, Jeong SY, Youle RJ. Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 2006; 443: 658-62.
- Karbowski M, Youle RJ. Dynamics of mitochondrial morphology in healthy cells and during apoptosis. *Cell Death Differ* 2003; 10: 870-80.
- Karuppagounder SS, Pinto JT, Xu H, Chen HL, Beal MF, Gibson GE. Dietary supplementation with resveratrol reduces plaque pathology in a transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurochem Int* 2009; 54: 111-8.
- Kelly DP, Scarpulla RC. Transcriptional regulatory circuits controlling mitochondrial biogenesis and function. *Genes Dev* 2004; 18: 357-68.
- Ketterer B, Meyer DJ, Tan KH. The role of glutathione transferase in the detoxication and repair of lipid and DNA hydroperoxides. *Basic Life Sci* 1988; 49: 669-74.
- Kim D, Nguyen MD, Dobbin MM, Fischer A, Sananbenesi F, Rodgers JT, et al. SIRT1 deacetylase protects against neurodegeneration in models for Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. *Embo J* 2007; 26: 3169-79.
- Kim SC, Sprung R, Chen Y, Xu Y, Ball H, Pei J, et al. Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell* 2006; 23: 607-18.
- Kirby DM, Crawford M, Cleary MA, Dahl HH, Dennett X, Thorburn DR. Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder. *Neurology* 1999; 52: 1255-64.
- Knott AB, Bossy-Wetzel E. Impairing the mitochondrial fission and fusion balance: a new mechanism of neurodegeneration. *Annals of the New York Academy of Sciences* 2008; 1147: 283-92.
- Koopman WJ, Verkaart S, Visch HJ, van Emst-de Vries S, Nijtmans LG, Smeitink JA, et al. Human NADH:ubiquinone oxidoreductase deficiency: radical changes in mitochondrial morphology? *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 293: C22-9.
- Krebs HA, Holzach O. The conversion of citrate into cis-aconitate and isocitrate in the presence of aconitase. *The Biochemical journal* 1952; 52: 527-8.
- Kulkens T, Bolhuis PA, Wolterman RA, Kemp S, te Nijenhuis S, Valentijn LJ, et al. Deletion of the serine 34 codon from the major peripheral myelin protein P0 gene in Charcot-Marie-Tooth disease type 1B. *Nat Genet* 1993; 5: 35-9.
- Lagouge M, Argmann C, Gerhart-Hines Z, Meziane H, Lerin C, Daussin F, et al. Resveratrol improves mitochondrial function and protects against metabolic disease by activating SIRT1 and PGC-1alpha. *Cell* 2006; 127: 1109-22.
- Landry J, Sutton A, Tafrov ST, Heller RC, Stebbins J, Pillus L, et al. The silencing protein SIR2 and its homologs are NAD-dependent protein deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 5807-11.
- Lardy HA, Wellman H. Oxidative phosphorylations; role of inorganic phosphate and acceptor systems in control of metabolic rates. *J Biol Chem* 1952; 195: 215-24.

- Lazarou M, McKenzie M, Ohtake A, Thorburn DR, Ryan MT. Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I. *Mol Cell Biol* 2007; 27: 4228-37.
- Lazarou M, Thorburn DR, Ryan MT, McKenzie M. Assembly of mitochondrial complex I and defects in disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1793: 78-88.
- Leal A, Morera B, Del Valle G, Heuss D, Kayser C, Berghoff M, et al. A second locus for an axonal form of autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease maps to chromosome 19q13.3. *Am J Hum Genet* 2001; 68: 269-74.
- Lee I, Bender E, Kadenbach B. Control of mitochondrial membrane potential and ROS formation by reversible phosphorylation of cytochrome c oxidase. *Mol Cell Biochem* 2002; 234-235: 63-70.
- Lee I, Salomon AR, Ficarro S, Mathes I, Lottspeich F, Grossman LI, et al. cAMP-dependent tyrosine phosphorylation of subunit I inhibits cytochrome c oxidase activity. *J Biol Chem* 2005; 280: 6094-100.
- Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators Fis1, Drp1, and Opal in apoptosis. *Mol Biol Cell* 2004; 15: 5001-11.
- Li N, Ragheb K, Lawler G, Sturgis J, Rajwa B, Melendez JA, et al. Mitochondrial complex I inhibitor rotenone induces apoptosis through enhancing mitochondrial reactive oxygen species production. *J Biol Chem* 2003; 278: 8516-25.
- Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443: 787-95.
- Lin SJ, Defossez PA, Guarente L. Requirement of NAD and SIR2 for life-span extension by calorie restriction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Science* 2000; 289: 2126-8.
- Lin SJ, Kaerberlein M, Andalis AA, Sturtz LA, Defossez PA, Culotta VC, et al. Calorie restriction extends *Saccharomyces cerevisiae* lifespan by increasing respiration. *Nature* 2002; 418: 344-8.
- Liu H, Nakagawa T, Kanematsu T, Uchida T, Tsuji S. Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *J Neurochem* 1999; 72: 1781-90.
- Logue SE, Martin SJ. Caspase activation cascades in apoptosis. *Biochem Soc Trans* 2008; 36: 1-9.
- Loiseau D, Chevrollier A, Verny C, Guillet V, Gueguen N, Pou de Crescenzo MA, et al. Mitochondrial coupling defect in Charcot-Marie-Tooth type 2A disease. *Ann Neurol* 2007; 61: 315-23.
- Lopez-Velez M, Martinez-Martinez F, Del Valle-Ribes C. The study of phenolic compounds as natural antioxidants in wine. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2003; 43: 233-44.
- Marco A, Cuesta A, Pedrola L, Palau F, Marin I. Evolutionary and structural analyses of GDAP1, involved in Charcot-Marie-Tooth disease, characterize a novel class of glutathione transferase-related genes. *Mol Biol Evol* 2004; 21: 176-87.
- Margulis L. Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles; criteria for proof. *Symp Soc Exp Biol* 1975: 21-38.

- Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell* 2005; 16: 4623-35.
- Miller KE, Sheetz MP. Axonal mitochondrial transport and potential are correlated. *J Cell Sci* 2004; 117: 2791-804.
- Misko A, Jiang S, Wegorzewska I, Milbrandt J, Baloh RH. Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci* 2010; 30: 4232-40.
- Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature* 1961; 191: 144-148.
- Moroni I, Morbin M, Milani M, Ciano C, Bugiani M, Pagliano E, et al. Novel mutations in the GDAP1 gene in patients affected with early-onset axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A. *Neuromuscul Disord* 2009; 19: 476-80.
- Nangaku M, Sato-Yoshitake R, Okada Y, Noda Y, Takemura R, Yamazaki H, et al. KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell* 1994; 79: 1209-20.
- Narita M, Shimizu S, Ito T, Chittenden T, Lutz RJ, Matsuda H, et al. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome c release in isolated mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 14681-6.
- Negre-Salvayre A, Hirtz C, Carrera G, Cazenave R, Troly M, Salvayre R, et al. A role for uncoupling protein-2 as a regulator of mitochondrial hydrogen peroxide generation. *Faseb J* 1997; 11: 809-15.
- Nelis E, Erdem S, Van Den Bergh PY, Belpaire-Dethiou MC, Ceuterick C, Van Gerwen V, et al. Mutations in GDAP1: autosomal recessive CMT with demyelination and axonopathy. *Neurology* 2002; 59: 1865-72.
- Neuspiel M, Zunino R, Gangaraju S, Rippstein P, McBride H. Activated mitofusin 2 signals mitochondrial fusion, interferes with Bax activation, and reduces susceptibility to radical induced depolarization. *J Biol Chem* 2005; 280: 25060-70.
- Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U. Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 2005; 170: 1067-78.
- Niemann A, Wagner KM, Ruegg M, Suter U. GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol Dis* 2009; 36: 509-20.
- Norris KL, Youle RJ. Cytomegalovirus proteins vMIA and m38.5 link mitochondrial morphogenesis to Bcl-2 family proteins. *J Virol* 2008; 82: 6232-43.
- Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, et al. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2003; 278: 7743-6.
- Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Bricchese L, Gas N, et al. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* 2002; 523: 171-6.

- Olichon A, Landes T, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ, Mils V, Guichet A, et al. Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. *J Cell Physiol* 2007; 211: 423-30.
- Onyango P, Celic I, McCaffery JM, Boeke JD, Feinberg AP. SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99: 13653-8.
- Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. *Apoptosis* 2007; 12: 913-22.
- Pagliarini DJ, Dixon JE. Mitochondrial modulation: reversible phosphorylation takes center stage? *Trends Biochem Sci* 2006; 31: 26-34.
- Papa S. The NDUFS4 nuclear gene of complex I of mitochondria and the cAMP cascade. *Biochim Biophys Acta* 2002; 1555: 147-53.
- Papa S, Capitanio N, Capitanio G, De Nitto E, Minuto M. The cytochrome chain of mitochondria exhibits variable H<sup>+</sup>/e<sup>-</sup> stoichiometry. *FEBS Lett* 1991; 288: 183-6.
- Parone PA, James DI, Da Cruz S, Mattenberger Y, Donze O, Barja F, et al. Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* 2006; 26: 7397-408.
- Pedrola L, Espert A, Valdes-Sanchez T, Sanchez-Piris M, Sirkowski EE, Scherer SS, et al. Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J Cell Mol Med* 2008; 12: 679-89.
- Pedrola L, Espert A, Wu X, Claramunt R, Shy ME, Palau F. GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1087-94.
- Pesch UE, Leo-Kottler B, Mayer S, Jurklics B, Kellner U, Apfelstedt-Sylla E, et al. OPA1 mutations in patients with autosomal dominant optic atrophy and evidence for semi-dominant inheritance. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1359-68.
- Petronilli V, Penzo D, Scorrano L, Bernardi P, Di Lisa F. The mitochondrial permeability transition, release of cytochrome c and cell death. Correlation with the duration of pore openings in situ. *J Biol Chem* 2001; 276: 12030-4.
- Piantadosi CA, Suliman HB. Mitochondrial transcription factor A induction by redox activation of nuclear respiratory factor 1. *J Biol Chem* 2006; 281: 324-33.
- Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, et al. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1405-15.
- Puomila A, Huoponen K, Mantyjarvi M, Hamalainen P, Paananen R, Sankila EM, et al. Dominant optic atrophy: correlation between clinical and molecular genetic studies. *Acta Ophthalmol Scand* 2005; 83: 337-46.
- Raeymaekers P, Timmerman V, Nelis E, De Jonghe P, Hoogendijk JE, Baas F, et al. Duplication in chromosome 17p11.2 in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 1a (CMT 1a). The HMSN Collaborative Research Group. *Neuromuscul Disord* 1991; 1: 93-7.
- Ratajewski M, Pulaski L. YY1-dependent transcriptional regulation of the human GDAP1 gene. *Genomics* 2009; 94: 407-13.

- Rodgers JT, Lerin C, Haas W, Gygi SP, Spiegelman BM, Puigserver P. Nutrient control of glucose homeostasis through a complex of PGC-1 $\alpha$  and SIRT1. *Nature* 2005; 434: 113-8.
- Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombes A. Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 2002; 115: 1663-74.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, et al. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry* 1994; 228: 35-51.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, LeBidois J, Sidi D, Rotig A, et al. Investigation of respiratory chain activity in human heart. *Biochemical medicine and metabolic biology* 1993; 50: 120-6.
- Sahin-Calapoglu N, Tan M, Soyoz M, Calapoglu M, Ozcelik N. Novel GDAP1 mutation in a Turkish family with CMT2K (CMT2K with novel GDAP1 mutation). *Neuromolecular Med* 2009; 11: 106-13.
- Saito M, Hayashi Y, Suzuki T, Tanaka H, Hozumi I, Tsuji S. Linkage mapping of the gene for Charcot-Marie-Tooth disease type 2 to chromosome 1p (CMT2A) and the clinical features of CMT2A. *Neurology* 1997; 49: 1630-5.
- Scarpulla RC. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells. *Gene* 2002; 286: 81-9.
- Scarpulla RC. Nuclear control of respiratory gene expression in mammalian cells. *J Cell Biochem* 2006; 97: 673-83.
- Schagger H. Quantification of oxidative phosphorylation enzymes after blue native electrophoresis and two-dimensional resolution: normal complex I protein amounts in Parkinson's disease conflict with reduced catalytic activities. *Electrophoresis* 1995; 16: 763-70.
- Schagger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* 2000; 19: 1777-83.
- Scorrano L, Ashiya M, Buttle K, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, et al. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2002; 2: 55-67.
- Senderek J, Bergmann C, Ramaekers VT, Nelis E, Bernert G, Makowski A, et al. Mutations in the ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 (GDAP1) gene in intermediate type autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth neuropathy. *Brain* 2003; 126: 642-9.
- Sevilla T, Jaijo T, Nauffal D, Collado D, Chumillas MJ, Vilchez JJ, et al. Vocal cord paresis and diaphragmatic dysfunction are severe and frequent symptoms of GDAP1-associated neuropathy. *Brain* 2008; 131: 3051-61.
- Shabalina IG, Kramarova TV, Nedergaard J, Cannon B. Carboxyatractyloside effects on brown-fat mitochondria imply that the adenine nucleotide translocator isoforms ANT1 and ANT2 may be responsible for basal and fatty-acid-induced uncoupling respectively. *Biochem J* 2006; 399: 405-14.
- Sheridan C, Delivani P, Cullen SP, Martin SJ. Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol Cell* 2008; 31: 570-85.

- Shield AJ, Murray TP, Board PG. Functional characterisation of ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 as a glutathione transferase. *Biochem Biophys Res Commun* 2006; 347: 859-66.
- Shimizu S, Narita M, Tsujimoto Y. Bcl-2 family proteins regulate the release of apoptogenic cytochrome c by the mitochondrial channel VDAC. *Nature* 1999; 399: 483-7.
- Sivera R, Espinos C, Vilchez JJ, Mas F, Martinez-Rubio D, Chumillas MJ, et al. Phenotypical features of the p.R120W mutation in the GDAP1 gene causing autosomal dominant Charcot-Marie-Tooth disease. *Journal of the peripheral nervous system : JPNS* 2010; 15: 334-44.
- Slee EA, Harte MT, Kluck RM, Wolf BB, Casiano CA, Newmeyer DD, et al. Ordering the cytochrome c-initiated caspase cascade: hierarchical activation of caspases-2, -3, -6, -7, -8, and -10 in a caspase-9-dependent manner. *J Cell Biol* 1999; 144: 281-92.
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Blik AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2001; 12: 2245-56.
- Smith JS, Brachmann CB, Celic I, Kenna MA, Muhammad S, Starai VJ, et al. A phylogenetically conserved NAD<sup>+</sup>-dependent protein deacetylase activity in the Sir2 protein family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 6658-63.
- Stepien G, Torroni A, Chung AB, Hodge JA, Wallace DC. Differential expression of adenine nucleotide translocator isoforms in mammalian tissues and during muscle cell differentiation. *J Biol Chem* 1992; 267: 14592-7.
- Stojkovic T, Latour P, Viet G, de Seze J, Hurtevent JF, Vandenberghe A, et al. Vocal cord and diaphragm paralysis, as clinical features of a French family with autosomal recessive Charcot-Marie-Tooth disease, associated with a new mutation in the GDAP1 gene. *Neuromuscul Disord* 2004; 14: 261-4.
- Stroh A, Anderka O, Pfeiffer K, Yagi T, Finel M, Ludwig B, et al. Assembly of respiratory complexes I, III, and IV into NADH oxidase supercomplex stabilizes complex I in *Paracoccus denitrificans*. *J Biol Chem* 2004; 279: 5000-7.
- Sugioka R, Shimizu S, Tsujimoto Y. Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 2004; 279: 52726-34.
- Susin SA, Lorenzo HK, Zamzami N, Marzo I, Snow BE, Brothers GM, et al. Molecular characterization of mitochondrial apoptosis-inducing factor. *Nature* 1999; 397: 441-6.
- Szabadkai G, Simoni AM, Chami M, Wieckowski MR, Youle RJ, Rizzuto R. Drp-1-dependent division of the mitochondrial network blocks intraorganellar Ca<sup>2+</sup> waves and protects against Ca<sup>2+</sup>-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2004; 16: 59-68.
- Tadolini B, Juliano C, Piu L, Franconi F, Cabrini L. Resveratrol inhibition of lipid peroxidation. *Free Radic Res* 2000; 33: 105-14.
- Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 2007; 282: 11521-9.
- Tanaka Y, Kanai Y, Okada Y, Nonaka S, Takeda S, Harada A, et al. Targeted disruption of mouse conventional kinesin heavy chain, kif5B, results in abnormal perinuclear clustering of mitochondria. *Cell* 1998; 93: 1147-58.



- Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 231-41.
- Tradewell ML, Durham HD, Mushynski WE, Gentil BJ. Mitochondrial and axonal abnormalities precede disruption of the neurofilament network in a model of charcot-marie-tooth disease type 2E and are prevented by heat shock proteins in a mutant-specific fashion. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2009; 68: 642-52.
- Valenti D, Manente GA, Moro L, Marra E, Vacca RA. Deficit of complex I activity in human skin fibroblasts with chromosome 21 trisomy and overproduction of reactive oxygen species by mitochondria: involvement of the cAMP/PKA signalling pathway. *The Biochemical journal* 2011; 435: 679-88.
- Valenzano DR, Terzibasi E, Genade T, Cattaneo A, Domenici L, Cellerino A. Resveratrol prolongs lifespan and retards the onset of age-related markers in a short-lived vertebrate. *Curr Biol* 2006; 16: 296-300.
- Vallat JM, Ouvrier RA, Pollard JD, Magdelaine C, Zhu D, Nicholson GA, et al. Histopathological findings in hereditary motor and sensory neuropathy of axonal type with onset in early childhood associated with mitofusin 2 mutations. *J Neuropathol Exp Neurol* 2008; 67: 1097-102.
- Vingtdeux V, Dreses-Werringloer U, Zhao H, Davies P, Marambaud P. Therapeutic potential of resveratrol in Alzheimer's disease. *BMC Neurosci* 2008; 9 Suppl 2: S6.
- Virbasius JV, Scarpulla RC. Activation of the human mitochondrial transcription factor A gene by nuclear respiratory factors: a potential regulatory link between nuclear and mitochondrial gene expression in organelle biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994; 91: 1309-13.
- Vogel RO, Smeitink JA, Nijtmans LG. Human mitochondrial complex I assembly: a dynamic and versatile process. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1767: 1215-27.
- Wagner KM, Ruegg M, Niemann A, Suter U. Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor. *PLoS One* 2009; 4: e5160.
- Wang Q, Xu J, Rottinghaus GE, Simonyi A, Lubahn D, Sun GY, et al. Resveratrol protects against global cerebral ischemic injury in gerbils. *Brain Res* 2002; 958: 439-47.
- Waterham HR, Koster J, van Roermund CW, Mooyer PA, Wanders RJ, Leonard JV. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med* 2007; 356: 1736-41.
- Wojtczak L, Wieckowski MR. The mechanisms of fatty acid-induced proton permeability of the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Biomembr* 1999; 31: 447-55.
- Xue L, Fletcher GC, Tolkovsky AM. Mitochondria are selectively eliminated from eukaryotic cells after blockade of caspases during apoptosis. *Curr Biol* 2001; 11: 361-5.
- Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 5409-20.
- Youle RJ, Karbowski M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 657-63.
- Youle RJ, Strasser A. The BCL-2 protein family: opposing activities that mediate cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 47-59.

- Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Karbowski M, Youle RJ, Schimpf S, et al. OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 2008; 131: 352-67.
- Zhang Q, Wang SY, Fleuriel C, Leprince D, Rocheleau JV, Piston DW, et al. Metabolic regulation of SIRT1 transcription via a HIC1:CtBP corepressor complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007; 104: 829-33.
- Zhao C, Takita J, Tanaka Y, Setou M, Nakagawa T, Takeda S, et al. Charcot-Marie-Tooth disease type 2A caused by mutation in a microtubule motor KIF1Bbeta. *Cell* 2001; 105: 587-97.
- Zhao T, Singhal SS, Piper JT, Cheng J, Pandya U, Clark-Wronski J, et al. The role of human glutathione S-transferases hGSTA1-1 and hGSTA2-2 in protection against oxidative stress. *Arch Biochem Biophys* 1999; 367: 216-24.
- Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, et al. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 2004; 36: 449-51.

# *FICHES TECHNIQUES*

## **Fiche Technique n°1 :** **Culture primaire de fibroblastes cutanés**

### **Milieux et réactifs :**

- DMEM-F12 (*Institut de biotechnologies, Jacques Boy, Reims, France*)
- SVF (*Institut de biotechnologies, Jacques Boy, Reims, France*)
- Amniomax® (*Gibco, New York, USA*)
- Trypsine-EDTA (*Gibco, New York, USA*)
- PBS (*Eurobio, Paris, France*)

### **Culture et récolte des fibroblastes :**

Après la biopsie cutanée, les fibroblastes cutanés sont cultivées à 37°C, en atmosphère humide, avec 5% de CO<sub>2</sub>, dans un milieu constitué de 2/3 de DMEM-F12 - 10% de SVF et 1/3 d'Amniomax® (Gibco™). Afin d'obtenir un stock de cellules de patients, les fibroblastes issus des premiers passages sont cryo-congelés, ce qui permet en plus de les préserver de l'adaptation aux conditions de culture qui favorisent le métabolisme glycolytique. Chaque passage est réalisé en repiquant 1/3 de la boîte initiale afin de conserver un rapport constant du nombre de division cellulaire par nombre de passage entre patients et témoins. Les travaux ont été réalisés à des passages < 20 pour éviter l'effet dû au vieillissement cellulaire.

Lorsque les cellules sont arrivées à confluence, elles sont lavées par du tampon phosphate sans calcium ni magnésium (PBS) puis décollées de leur support par de la trypsine 0,25 %-EDTA 0,02 %. Elles sont ensuite resuspendues dans du PBS - 10% SVF puis centrifugées 5 minutes à 800 rpm.

## Fiche Technique n°2 : Dosage des protéines par mesure spectrophotométrique

Il est réalisé à l'aide du kit BC Assay® (*Interchim, Montluçon, France*). Le principe du dosage repose sur le fait qu'en milieu alcalin, les protéines réduisent les ions cuivriques  $\text{Cu}^{2+}$  en ions cuivreux  $\text{Cu}^{+}$ . Les ions cuivreux et l'acide bicinchoninique vont alors former un complexe soluble coloré en violet. L'absorbance est directement proportionnelle à la concentration protéique qui est calculée à l'aide d'une gamme étalon de sérum albumine bovine (BSA).

### Réactifs :

- Solution d'acide bicinchoninique : réactif A
- Solution de sulfate de cuivre : réactif B
- Solution standard de BSA 1mg/ml

### Technique :

- Préparer la solution de travail A+B :
  - 49 volumes de réactif A
  - 1 volume de réactif B
- Préparer la gamme étalon de BSA:
  - Point à 0,125 mg/ml : 15  $\mu\text{l}$  de BSA à 0,125 mg/ml + 300  $\mu\text{l}$  de solution A+B
  - Point à 0,25 mg/ml : 15  $\mu\text{l}$  de BSA à 0,25 mg/ml + 300  $\mu\text{l}$  de solution A+B
  - Point à 0,5 mg/ml : 15  $\mu\text{l}$  de BSA à 0,5 mg/ml + 300  $\mu\text{l}$  de solution A+B
- Préparer un blanc :
  - 15  $\mu\text{l}$  de NaCl 0,9%
  - 300  $\mu\text{l}$  de solution A+B
- Préparer les échantillons :
  - 15  $\mu\text{l}$  d'échantillon (suspension cellulaire) dilué dans le NaCl 0,9% de manière à être dans la gamme
  - 300  $\mu\text{l}$  de solution A+B
- Incuber 30 min à 37°C
- Lire l'absorbance à 562 nm contre le blanc

### Fiche Technique n°3 : Mesure des paramètres respiratoires sur fibroblastes perméabilisés par oxygraphie

Cette technique consiste à mesurer les vitesses de consommation d'oxygène de cellules perméabilisées dans différents états métaboliques. La mesure est réalisée à l'aide d'un oxygraphe Oroboros O2k (*Oroboros, Innsbruck, Autriche*) contenant une électrode de «Clark» sensible à l'oxygène. Elle est composée d'une cathode en platine et d'une anode en argent. L'anode et la cathode sont connectées par une solution de KCL formant un pont salin et sont recouvertes d'une fine membrane perméable à l'O<sub>2</sub> dissous. Une tension constante est appliquée aux deux électrodes de sorte que la cathode soit chargée négativement. Les ions Cl<sup>-</sup> attaquent l'argent ce qui libèrent des électrons qui vont réduire l'O<sub>2</sub> en H<sub>2</sub>O en présence de protons. Le mouvement des électrons crée un courant électrique proportionnel en O<sub>2</sub> qui est enregistré sous forme de potentiel.

L'équation de la réaction est la suivante :



La variation de courant induite par la réduction de l'oxygène au niveau de la cathode est directement proportionnelle à la concentration d'oxygène dissoute dans le milieu d'incubation. Ces variations de courant sont amplifiées et inscrites sur une table traçante. Une analyse du tracé permet d'obtenir les mesures d'intensités respiratoires par le calcul suivant :

$$\text{IR} = \frac{p \times 203}{200 \times [c]}$$

IR : intensité respiratoire (nmol O<sub>2</sub>/min/mg<sub>prot</sub>)

p : pente mesurée sur le tracé (mm/min)

203 : solubilité de l'oxygène dans le milieu à 37°C (nmol O<sub>2</sub>/ml)

200 : pleine échelle (200mm)

[c] : concentration protéique (mg/ml)

L'oxygraphe est composé de deux chambres thermostatées de 2ml disposant d'une agitation magnétique et est piloté par un ordinateur. Elle est calibrée dans le milieu d'incubation équilibré à l'air à 37°C. Une solution de dithionite de sodium, un agent réducteur qui va peu à peu consommer l'oxygène contenu dans le milieu, est injectée dans la chambre, donnant ainsi le 0% d'oxygène. Pour le 100%, la consommation d'oxygène est mesurée sous agitation, cuve ouverte avec du milieu.

### **Réactifs :**

- Tampon de respiration avec ou sans BSA
  - $\text{KH}_2\text{PO}_4$  : 10 mM
  - Mannitol : 300 mM
  - KCl : 10 mM
  - $\text{MgCl}_2$  : 5mM
  - BSA : 1 mg/mlAjuster à pH 7,4
- Digitonine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mg/ml chauffer à 95°C, 2.5 min.
- Malate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M, pH 7,0
- Pyruvate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Succinate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 0,5 M, pH 7,0
- $\text{NAD}^+$  (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 50 mM
- ADP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 150 mM
- Roténone (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM
- Oligomycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 8 mg/ml
- FCCP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mM

### **Préparation des cellules :**

Pour déterminer la consommation d'oxygène maximale des mitochondries de fibroblastes, les substrats de la chaîne respiratoire doivent être apportés en excès. Le culot cellulaire (3 millions de cellules) est repris dans du tampon de respiration sans BSA à raison de 50  $\mu\text{l}$ /millions de cellules. Afin de perméabiliser les fibroblastes, les cellules sont incubées pendant 2min30 en présence de la digitonine (15  $\mu\text{g}$  par millions de cellules), puis 4 volumes de tampon de respiration avec BSA sont ajoutés au mélange afin d'inhiber l'action de la digitonine. Elles sont ensuite centrifugées 2min30 à 800 rpm. Le surnageant est éliminé, puis les cellules sont reprises dans 200  $\mu\text{l}$  de tampon de respiration avec BSA et placées dans les chambres de l'oxygraphe contenant 1,9 ml de tampon de respiration avec BSA.

### **Oxygraphie :**

Les substrats du complexe I, puis du complexe II seront ajoutés successivement afin de déterminer la respiration dirigée par chacun de ces complexes.

- Reprendre les cellules dans 200  $\mu\text{l}$  de tampon de respiration avec BSA
- Mettre 1,9 ml de tampon de respiration avec BSA dans la cuve de l'oxygraphe et ajouter

les 200µl de milieu avec les cellules.

- Ajouter dans la cuve :
  - Malate 0,5 M : 20 µl (5 mM final)
  - Pyruvate 0,5 M : 20µl (5 mM final)
  - NAD<sup>+</sup> 50 mM : 20µl (0,5 mM final)
  - ADP 150mM : 20µl (1,5 mM)
  - Succinate 0,5 M : 40µl (10 mM final)
  - Roténone 2,5 mM : 8 µl (10 µM final)
  - Oligomycine 8 mg/ml : 2µl (8 µg/ml final)
  - FCCP 1 mM : 2µl (1 µM final)
- Prélever 4 fois 400µl dans la cuve pour le dosage des protéines



## Fiche Technique n°4 :

### Mesure de la consommation d'oxygène et de la synthèse d'ATP sur fibroblastes : détermination du rapport ATP/O

Cette technique consiste à déterminer l'efficacité de la phosphorylation oxydative en dosant sur une même suspension de fibroblastes, la consommation d'oxygène et le taux de synthèse d'ATP correspondant. La consommation d'oxygène est mesurée à l'aide d'un oxygraphe Oroboros O2k (*Oroboros, Innsbruck, Autriche*) comme précédemment.

#### 1. Détermination de la consommation d'oxygène des fibroblastes par oxygraphie

##### Réactifs :

- Tampon de respiration avec ou sans BSA
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 10 mM
  - Mannitol : 300 mM
  - KCl : 10 mM
  - MgCl<sub>2</sub> : 5mM
  - BSA : 1 mg/mlAjuster à pH 7,4
- Tampon de respiration avec BSA et inhibiteurs
  - Tampon de respiration avec BSA : 9,8 ml
  - EDTA 200 mM : 100 µl
  - Iodoacétate 200 mM : 100 µl
- Digitonine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mg/ml chauffer à 95°C, 2.5 min.
- EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 200 mM, pH 7,0
- Iodoacétate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 200 mM
- Malate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M, pH 7,0
- Pyruvate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Succinate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M, pH 7,0
- NAD<sup>+</sup> (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 50 mM
- ADP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 150 mM
- Oligomycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 8 mg/ml
- Atractyloside (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 7,5 mM

- FCCP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mM
- Acide Trichloroacétique (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1%

### **Préparation des cellules :**

Pour déterminer la consommation d'oxygène maximale des mitochondries de fibroblastes, les substrats de la chaîne respiratoire doivent être apportés en excès. Le culot cellulaire (3 millions de cellules) est repris dans du tampon de respiration sans BSA à raison de 50 µl/millions de cellules. Afin de perméabiliser les fibroblastes, les cellules sont incubées pendant 2min30 en présence de la digitonine (15 µg par millions de cellules), puis 4 volumes de tampon de respiration avec BSA sont ajoutés au mélange afin d'inhiber l'action de la digitonine. Elles sont ensuite centrifugées 2min30 à 800 rpm. Le surnageant est éliminé, puis les cellules sont reprises dans 200 µl de tampon de respiration avec BSA

### **Oxygraphie :**

Les mesures sont réalisées à l'aide d'un oxygraphe (*Oroboros, Innsbruck, Autriche*) en présence des substrats du complexe I (malate-pyruvate) et du complexe II (succinate).

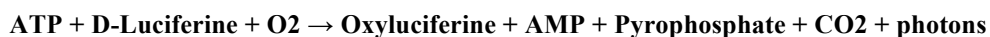
Les cellules sont reprises dans 200 µl de tampon de respiration avec BSA supplémenté en iodoacétate [2 mM] et EDTA [2 mM] afin de bloquer la synthèse d'ATP glycolytique et l'hydrolyse de l'ATP par les ATPases cellulaires, et sont placées dans les chambres de l'oxygraphe contenant 1,9 ml de tampon de respiration avec BSA et inhibiteurs.

- Dans la cuve, ajouter successivement :
  - Malate 0,5 M : 20 µl (5 mM final)
  - Pyruvate 0,5 M : 20µl (5 mM final)
  - Succinate 0,5 M : 20µl (5 mM final)
- Après obtention d'un plateau lorsque le flux d'oxygène est stable, prélever 10 µl toutes les 30 secondes dans la cuve (3 prélèvements) et ajouter 10 µl d'acide trichloroacétique (TCA) 1%. Le TCA, par son acidité, précipite les protéines, inhibe les ATPases et permet d'éviter l'hydrolyse de l'ATP. Ces prélèvements permettront de s'assurer qu'il n'y a pas de synthèse glycolytique d'ATP.
- Par la suite, ajouter:
  - NAD<sup>+</sup> 50 mM : 20µl (0,5 mM final)
  - ADP 150mM : 20µl (1,5 mM)
- Dès que le tracé s'est stabilisé, réaliser 5 prélèvements de 10 µl à 30 secondes d'intervalle et déprotéinésés en présence de TCA 1% pour inhiber l'hydrolyse de l'ATP.

- Puis, ajouter 8 µg d'oligomycine et 30µM d'atractyloside. L'atractyloside est un inhibiteur de l'ANT (adénine nucléotide translocase) assurant l'échange ADP/ATP du cytoplasme vers la matrice. Atractyloside et oligomycine permettent ainsi de bloquer la synthèse mitochondriale d'ATP, et la sortie d'ATP résiduel de la mitochondrie vers le cytoplasme.
- Réaliser 3 prélèvements à ce stade afin de contrôler l'absence de synthèse résiduelle d'ATP (glycolytique) ou d'hydrolyse d'ATP (inhibition imparfaite des ATPases cellulaires).
- Pour finir, la perméabilisation et la viabilité cellulaire sont contrôlées en ajoutant 1µM FCCP.
- Prélever 4 fois 400µl dans la cuve pour le dosage des protéines

## **2. Dosage de la synthèse d'ATP sur fibroblastes par bioluminescence**

Cette technique utilise le système luciférine – luciférase pour catalyser la réaction suivante :



Le dosage est réalisé à partir du kit ENLITEN ATP Assay System (*Promega, Madison, USA*) et du luminomètre MiniLumat LB 9506 (*Berthold technologies, TN, USA*).

### **Réactifs :**

- Kit ENLITEN ATP Assay System (*Promega, Madison, USA*)
  - Réactif L/L (luciférine/luciférase)
  - Tampon de reconstitution (12 ml)
  - Solution standard d'ATP ( $10^{-7}$  M)
  - Un flacon d'eau ATP-free (25 ml)

Le kit est conservé à -20°C et ses constituants ne doivent pas être exposés à la lumière

- Tampon de Neutralisation
  - Hepes 25 mM
  - EDTA 2 mM

Ajuster à pH 7,75 et autoclaver pour éliminer toute trace d'ATP

### **Préparation des échantillons :**

- Ajouter à chaque échantillon prélevé au cours de l'oxygraphie 980 µl de tampon de neutralisation

- Vortexer et laisser décongeler à température ambiante
- Diluer chaque échantillon au 1/10ème par million soit par exemple 1/30ème pour 3 millions de cellules

### **Dosage :**

Le kit doit être sorti 1 à 2 heures avant le dosage. Une fois décongelé, le réactif L/L est reconstitué à l'abri de la lumière par la totalité du tampon de reconstitution puis agité par retournements. Il doit être régénéré au moins 30 minutes avant le dosage qui doit être réalisé dans les 4 heures. Le dosage est réalisé à l'abri de la lumière.

- Préparer une gamme d'ATP de  $10^{-7}$  à  $10^{-11}$  M. A partir de la solution standard, faire des dilutions en cascade au 1/10ème dans l'eau ATP-free (10 µl de la dilution précédente + 90 µl d'eau)
- Prendre un tube adapté au bioluminomètre et déposer 10 µl de l'échantillon à doser
- Ajouter 90 µl de solution L/L
- Faire aussitôt une mesure de 10 secondes au bioluminomètre
- Faire de même pour chaque point de gamme et chaque échantillon

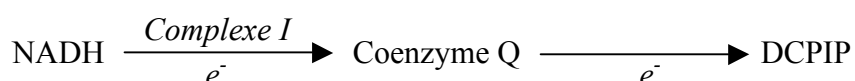
Les résultats sont obtenus en RLU (unité de lumière relative). A partir de la droite étalon obtenue par la gamme d'ATP, on en déduit la concentration en ATP de notre échantillon. Il suffira ensuite de multiplier cette concentration par les différents facteurs de dilution utilisés lors de la préparation, soit, pour un échantillon de départ de 3 millions de cellules :

[ATP] mesurée  $\times 30 \times 100 \times 1000$ .

On obtient ainsi la concentration présente dans la cuve de l'oxygraphe en nmol/ml. Cette concentration sera rapportée à la quantité de protéines présente dans l'échantillon. Pour le calcul du rapport ATP/O (efficacité des phosphorylations oxydatives), la droite des valeurs d'ATP en fonction du temps est tracée. L'équation de la droite et le coefficient de régression sont calculés. La pente de la droite correspond à la synthèse d'ATP en nmol d'ATP /min/mg de protéines. On en déduit ensuite le rapport ATP/O en nous basant sur les paramètres respiratoires mesurés en parallèle.

## **Fiche Technique n°5 :** **Dosage de l'activité NADH Ubiquinone Réductase** **(Complexe I) sur fibroblastes**

Le dosage de l'activité du complexe I est réalisé en présence d'un accepteur d'électrons artificiel, le 2,6-dichlorophénol-indophénol (DCPIP). L'activité est donc mesurée en suivant la réduction du DCPIP par la baisse de l'absorbance à 600 nm du DCPIP oxydé.



En cours de dosage, de la roténone (inhibiteur du complexe I) est ajoutée pour soustraire l'activité non sensible à la roténone et donc non spécifique du complexe I.

### **Réactifs :**

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 20 mM
  - EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH 7,4
- Ubiquinone 1 (CoQH1) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM
- Azide de sodium (NaN<sub>3</sub>) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 M
- Roténone (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 mM
- Cyanure de potassium (KCN) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- DCPIP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mM
- NADH (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 15 mM
- BSA (sérum albumine bovine) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mg/ml

### **Préparation des cellules :**

Les cellules sont congelées en culots secs.

- Décongeler les cellules à température ambiante
- Reprendre le culot par 50 µl de tampon A par million de cellules et maintenir les cellules

dans la glace

- Congeler la suspension cellulaire par immersion dans l'azote liquide pendant 3 minutes
- Décongeler rapidement au bain marie à 37°C
- Centrifuger 30 secondes à 16000 g
- Retirer le surnageant et reprendre le culot dans 50 µl de tampon A par million de cellules
- Transvaser les cellules dans un tube en verre résistant à la sonication et compléter avec du tampon A qsp 250 µl par million de cellules
- Soniquer les cellules maintenues dans la glace 6 fois 5 secondes avec 30 secondes de repos entre chaque sonication. Le sonicateur est réglé à une amplitude de 39%
- Cette étape doit être réalisée juste avant le dosage.

### **Technique :**

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en verre :

<b>Réactifs</b>	<b>Volume (µl)</b>	<b>Concentration finale</b>
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,4</b>	815	80 mM
<b>KCN 0,5 M</b>	2	1 mM
<b>NaN<sub>3</sub> 1 M</b>	2	2 mM
<b>BSA 50 mg/ml</b>	20	1 mg/ml
<b>Eau ppi</b>	25	
<b>CoQH1 2,5 mM</b>	40	0,1 mM
<b>DCPIP 5 mM</b>	15	75 µM

- Incuber 3 minutes à 37°C
- Ajouter 250.000 cellules soit 62,5 µl
- Démarrer la réaction en ajoutant 20 µl de NADH 15 mM
- Suivre la variation d'absorbance à 600 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre (*Beckman DU 640, Beckman coulter, Fullerton, CA, USA*) pendant 40 secondes, puis
- Ajouter : 4 µl de roténone 0,5 mM dans la cuve
- Suivre la variation d'absorbance à 600 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre pendant 40 secondes

La variation de densité optique par minute est mesurée avec et sans roténone et l'activité enzymatique en nmol de DCPIP oxydé/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

**Activité spécifique :**

$$AS = \frac{(\Delta DO^{-rot} - \Delta DO^{+rot})}{l \times \epsilon_{DCPIP} \times S_{nDCPIP}} \times \frac{10^3}{q_{cellules}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta DO^{-Rot}$ : variation de densité optique par minute à 600 nm mesurée sans roténone

$\Delta DO^{+Rot}$ : variation de densité optique par minute à 600 nm mesurée avec roténone

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{DCPIP}$ : coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600 nm = 19,1 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

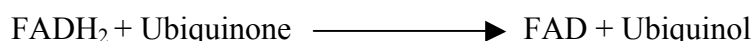
S<sub>nDCPIP</sub> : nombre stoechiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit : 1

q<sub>cellules</sub> : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,25

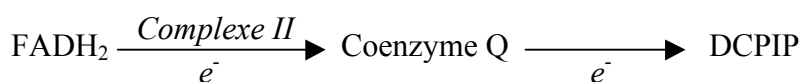
## Fiche Technique n°6 : Dosage de l'activité Succinate Ubiquinone Réductase (Complexe II) sur fibroblastes

La technique de mesure de l'activité du complexe II est adaptée à partir de celle décrite par James et al. (1996).

La réaction enzymatique catalysée par le complexe II est la suivante :



Lors de cette réaction, le succinate réduit l'ubiquinone en ubiquinol. Le dosage fait intervenir une seconde réaction impliquant un composé chimique de couleur bleue, le DCPIP (dichlorophenolindophenol) qui absorbe la lumière à 600 nm. Ce dernier va être réduit par l'ubiquinol-2 formé lors de la réaction précédente. Le DCPIP perd alors sa couleur bleue et n'absorbe plus de lumière. La réaction pour doser le complexe II va donc consister à suivre la diminution de l'absorbance du DCPIP à 600 nm, celle-ci étant proportionnelle à l'ubiquinol formé.



### Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) 20 mM
  - EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH 7,5
- Ubiquinone 1 (CoQH1) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM
- Succinate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- Cyanure de potassium (KCN) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- BSA (sérum albumine bovine) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mg/ml



- Triton 100X (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10%
- DCPIP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 5 mM
- Antimycine A (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/ml
- Roténone (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM
- Thenoyltrifluoroacétone (TTFA) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 40 mM

### **Préparation des cellules :**

Les cellules sont congelées en culots secs.

- Décongeler les cellules à température ambiante
- Reprendre le culot par 50 µl de tampon A par million de cellules et maintenir les cellules dans la glace
- Congeler la suspension cellulaire par immersion dans l'azote liquide pendant 3 minutes
- Décongeler rapidement au bain marie à 37°C
- Centrifuger 30 secondes à 16000 g
- Retirer le surnageant et reprendre le culot dans 50 µl de tampon A par million de cellules

### **Technique :**

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en verre :

<b>Réactifs</b>	<b>Volume (µl)</b>	<b>Concentration finale</b>
<b>Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100 mM, pH 7,5</b>	500	50 mM
<b>Succinate 0,5 M</b>	40	20 mM
<b>KCN 10 mM</b>	200	2 mM
<b>EDTA 10 mM</b>	10	0,1 mM
<b>BSA 50 mg/ml</b>	20	1 mg/ml
<b>Roténone 2,5 mM</b>	4	10 µM
<b>Antimycine A 1 mg/ml</b>	2	2 µM
<b>DCPIP 5 mM</b>	15	80 µM
<b>Triton 10X</b>	2	0,02%
<b>Eau ppi</b>	160	

- Incuber 2 minutes à 37°C
- Ajouter 500.000 cellules soit 25 µl
- Démarrer la réaction en ajoutant 20 µl d'ubiquinone-1 2,5 mM soit 50 µM

- Suivre la variation d'absorbance à 600 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre (*Beckman DU 640, Beckman coulter, Fullerton, CA, USA*) pendant 90 secondes.

- Puis ajouter :

<b>TTFA 40 mM</b>	5	0,2 mM
-------------------	---	--------

- Suivre la variation d'absorbance à 600 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre pendant 90 secondes.

La variation de densité optique par minute est mesurée avec et sans TTFA et l'activité enzymatique en nmol de DCPIP oxydé/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Activité spécifique : AS} = \frac{(\Delta\text{DO}^{-\text{TTFA}} - \Delta\text{DO}^{+\text{TTFA}})}{l \times \epsilon_{\text{DCPIP}} \times \text{Sn}_{\text{DCPIP}}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

AS : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta\text{DO}^{-\text{TTFA}}$ : variation de densité optique par minute à 600 nm mesurée sans TTFA

$\Delta\text{DO}^{+\text{TTFA}}$ : variation de densité optique par minute à 600 nm mesurée avec TTFA

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

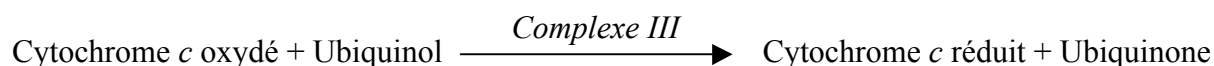
$\epsilon_{\text{DCPIP}}$ : coefficient d'extinction molaire du DCPIP à 600 nm = 19,1 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

$\text{Sn}_{\text{DCPIP}}$  : nombre stoechiométrique du DCPIP dans l'équation de la réaction, soit : 1

$q_{\text{cellules}}$  : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,5

## Fiche Technique n°7 : Dosage de l'activité Ubiquinol Cytochrome c Réductase (Complexe III) sur fibroblastes

La réaction enzymatique catalysée par le complexe III est la suivante :



Le dosage consiste à suivre la réduction du cytochrome *c* oxydé à 550 nm. Le cytochrome *c* réduit absorbe la lumière à 550 nm, donc l'apparition de la forme réduite du cytochrome *c* entraînera une augmentation de l'absorbance à 550 nm qui sera proportionnelle à l'activité du complexe III. L'antimycine A est un des inhibiteurs spécifiques du complexe III. L'activité spécifique du complexe III est donc calculée par la différence entre l'activité totale et celle résistante à l'antimycine A qui est mesurée par un dosage parallèle en présence d'antimycine A. Cette technique est adaptée de celle décrite par Rustin et al. (1993).

### Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) 20 mM
  - EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 20 mM, pH 7,8
- EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 20 mM
- Cyanure de potassium (KCN) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- BSA (sérum albumine bovine) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mg/ml
- Antimycine A (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/ml
- Cytochrome *c* oxydé (*Acros, Noisy-Le-Grand, France*) : 1 mM
- Décylubiquinol : 25 mM
- Roténone (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM

### Préparation des cellules :

Les cellules sont congelées en culots secs.

- Décongeler les cellules à température ambiante
- Reprendre le culot par 50 µl de tampon A par million de cellules et maintenir les cellules dans la glace
- Congeler la suspension cellulaire par immersion dans l'azote liquide pendant 3 minutes
- Décongeler rapidement au bain marie à 37°C
- Centrifuger 30 secondes à 16000 g
- Retirer le surnageant et reprendre le culot dans 50 µl de tampon A par million de cellules

### Technique :

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en verre :

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
Tampon KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 20 mM, pH 7,8	500	10 mM
EDTA 20 mM	100	2 mM
BSA 50 mg/ml	20	1 mg/ml
KCN 10 mM	24	0,24 mM
Cytochrome c oxydé 1mM	40	40 µM
Roténone 2,5 mM	2 µl	5 µM
Eau ppi	307	
Cellules	5	100 000 cellules

- Incuber 2 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 2 µl de Décylibiquinol 25 mM soit 75 µM
- Suivre la variation d'absorbance à 550 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre (*Beckman DU 640, Beckman coulter, Fullerton, CA, USA*) pendant 66 secondes.
- Faire le même dosage avec 4 µl d'Antimycine 1 mg/ml dans le milieu réactionnel soit 4 µg/ml final
- La variation de densité optique par minute est mesurée avec et sans antimycine et l'activité enzymatique en nmol de Cytochrome c réduit/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Activité spécifique : } AS = \frac{(\Delta DO^{-\text{Anti}} - \Delta DO^{+\text{Anti}})}{l \times \epsilon_{\text{Cyt } c} \times \text{Sn}_{\text{Cyt } c}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

AS : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta DO^{-\text{Anti}}$  : variation de densité optique par minute à 550 nm sans antimycine

$\Delta DO^{+\text{Anti}}$  : variation de densité optique par minute à 550 nm avec antimycine

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{\text{Cyt } c}$  : coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* à 550 nm = 18,5 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

Sn<sub>Cyt c</sub> : nombre stoechiométrique du cytochrome *c* dans l'équation de la réaction, soit : 1

q<sub>cellules</sub> : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,1

### **Préparation du décylubiquinol (25 mM) :**

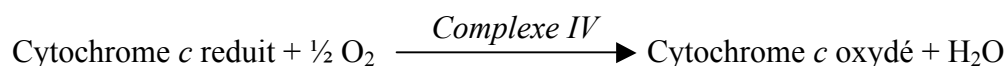
Cette préparation se fait à l'abri de la lumière.

- Préparer une solution de décylubiquinone (*Biomol Research Labs, Plymouth Meeting, PA, USA*) à 13 mM (20 mg dans 4.8 ml d'éthanol).
- Prendre le spectre de la solution oxydée (1 µl + 1 ml d'éthanol dans une cuve en quartz) et noter le pic d'absorbance à 275 nm qui doit être aux alentours de 2,6.
- Sous une hotte, ajouter quelques cristaux de borohydrure de sodium (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) et agiter.
- Acidifier avec 30µl d'HCl 12M, 37% jusqu'à décoloration de la solution en jaune pâle.
- Centrifuger cette solution 15 minutes à 4000 rpm et récupérer le surnageant.
- Prendre le spectre de la solution réduite (1 µl + 1 ml d'éthanol dans une cuve en quartz) et noter le pic d'absorbance à 285 nm qui doit être aux alentours de 0,7.
- Ajouter 5 ml de tampon (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,1 M; Sorbitol 0,25 M; pH 7,4), puis 3 ml de cyclohexane.
- Agiter fortement pendant 5 minutes et laisser décanter quelques secondes
- Centrifuger 10 minutes à 1000 g afin d'extraire la phase organique et la récupérer dans un tube en verre. Faire plusieurs extractions au cyclohexane (2 à 3 fois) et rassembler les phases organiques.
- Evaporer le cyclohexane sous courant d'azote afin d'éviter la réoxydation de la solution et peser le tube contenant l'extrait sec.
- Reprendre le résidu dans 2 ml de cyclohexane et faire des aliquotes de 60 µl.
- Evaporer sous azote et conserver à -80°C.
- Peser le tube ayant contenu l'extrait sec après l'avoir nettoyé et séché afin de déterminer la masse de l'extrait sec.

- Déduire la masse d'extrait par aliquote afin de déterminer la quantité d'éthanol nécessaire à la reprise de chaque aliquote pour avoir une concentration de 25 mM.

## Fiche Technique n°8 : Dosage de l'activité Cytochrome c Oxydase (Complexe IV) sur fibroblastes

La réaction enzymatique catalysée par le complexe IV est la suivante :



Le complexe IV de la chaîne respiratoire permet l'oxydation du cytochrome *c*, son activité sera donc évaluée par la disparition du cytochrome *c* réduit qui absorbe à 550 nm. L'accepteur naturel des électrons du complexe IV est l'oxygène.

### Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) 20 mM
  - EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH 6,5
- BSA (sérum albumine bovine) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mg/ml
- Laurylmaltoside (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 125 mM
- Cytochrome *c* oxydé (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mM
- Cytochrome *c* réduit : 100 μM

### Préparation des cellules :

Les cellules sont congelées en culots secs.

- Décongeler les cellules à température ambiante
- Reprendre le culot par 50 μl de tampon A par million de cellules et maintenir les cellules dans la glace
- Congeler la suspension cellulaire par immersion dans l'azote liquide pendant 3 minutes
- Décongeler rapidement au bain marie à 37°C
- Centrifuger 30 secondes à 16000 g
- Retirer le surnageant et reprendre le culot dans 50 μl de tampon A par million de cellules

### Technique :

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en verre :

Réactifs	Volume ( $\mu\text{l}$ )	Concentration finale
BSA 50 mg/ml	20	1 mg/ml
Eau ppi	455	
Cytochrome <i>c</i> réduit 100 $\mu\text{M}$	500	50 $\mu\text{M}$

- Incuber 3 minutes à 37°C
- Ajouter 5  $\mu\text{l}$  de cellules soit 100.000 cellules
- Démarrer la réaction en ajoutant 20  $\mu\text{l}$  de laurylmaltoside 125 mM soit 2,5 mM
- Suivre la variation d'absorbance à 550 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre (*Beckman DU 640, Beckman coulter, Fullerton, CA, USA*) pendant 90 secondes.
- La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de Cytochrome *c* réduit/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Activité spécifique : } AS = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{\text{Cyt } c} \times S_{\text{Cyt } c}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en  $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg de prot.}^{-1}$

$\Delta DO$  : variation de densité optique par minute à 550 nm

$l$  : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{\text{Cyt } c}$  : coefficient d'extinction molaire du cytochrome *c* à 550 nm =  $18,5 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$

$S_{\text{Cyt } c}$  : nombre stoechiométrique du cytochrome *c* dans l'équation de la réaction, soit : 1

$q_{\text{cellules}}$  : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,1

### Préparation du cytochrome *c* réduit (50 $\mu\text{M}$ ) :

- Diluer la solution de Cytochrome *c* oxydé 1 mM : 1ml + 9 ml de tampon phosphate 100 mM, pH 6,5 (C).
- Oxyder 1 ml de cette solution (O) par quelques cristaux de ferricyanure de potassium.
- Réduire 1 ml de cette solution (R) par quelques cristaux de dithionite de sodium.
- Mesurer le rapport des densités optiques à 550/560 nm des solutions oxydées et réduites
- Le rapport sera proche de 1,16 pour la solution 100% oxydée et entre 7,1 et 10 pour la 100% réduite.



- A partir des densités optiques à 550 nm, on calcule la DO à obtenir pour avoir une solution de cytochrome *c* réduite entre 92 et 97 % en utilisant les formules suivantes :

- $DO_{(92\%)} = DO_{100\% \text{ oxydée}} + [(DO_{100\% \text{ réduite}} - DO_{100\% \text{ oxydée}}) \times 0,92]$

- $DO_{(97\%)} = DO_{100\% \text{ oxydée}} + [(DO_{100\% \text{ réduite}} - DO_{100\% \text{ oxydée}}) \times 0,97]$

- Ajouter le cytochrome *c* réduit obtenu précédemment (solution R) par fractions de 20 µl aux 8 ml de Cytochrome *c* (C) restant et mesurer la densité optique à 550 nm de façon à obtenir la DO désirée et être à 92-97% de réduction.

## Fiche Technique n°9 : Dosage de l'activité de l'ATP synthase (Complexe V) sur fibroblastes

Ce dosage consiste à mesurer l'oxydation du NADH. Le NADH peut aussi être oxydé par la cytochrome *b5* réductase de la membrane mitochondriale externe. Le dosage est donc également réalisé en présence d'oligomycine (inhibiteur du complexe V) pour soustraire l'activité non sensible à l'oligomycine et donc non spécifique du complexe V. Cette technique est adaptée de celle décrite par Rustin et al. (1994).

### Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) 20 mM
  - EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- FCCP (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- Antimycine A (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mg/ml
- Oligomycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/ml
- NADH (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 2 mM
- Lactate déshydrogénase (LDH) (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 5 U/ $\mu$ l
- Pyruvate kinase (PK) (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 5 U/ $\mu$ l
- *Tampon G1*
  - phosphoenolpyruvate (PEP) : 2 mM
  - ATP : 0,5 mM
  - MgCl<sub>2</sub> : 5 mM
  - KCl : 10 mM
  - Tris : 50 mM
  - BSA : 5 mg/mlAjuster à pH 8,0

● *Tampon G2* :

Pour 5 ml de tampon G1, ajouter :

- FCCP 10 mM : 1,5 µl soit 3 µM final
- Antimycine 2,5 mg/ml : 1 µl soit 0,5 µg/ml
- LDH 5 U/µl : 20 µl soit 20 mU/µl
- PK 5 U/µl : 20 µl soit 20 mU/µl

**Préparation des cellules :**

Les cellules sont congelées en culots secs.

- Décongeler les cellules à température ambiante
- Reprendre le culot par 50 µl de tampon A par million de cellules et maintenir les cellules dans la glace
- Congeler la suspension cellulaire par immersion dans l'azote liquide pendant 3 minutes
- Décongeler rapidement au bain marie à 37°C
- Centrifuger 30 secondes à 16000 g
- Retirer le surnageant et reprendre le culot dans 50 µl de tampon A par million de cellules
- Transvaser les cellules dans un tube en verre résistant à la sonication et compléter avec du tampon A qsp 250 µl par million de cellules
- Soniquer les cellules maintenues dans la glace 6 fois 5 secondes avec 30 secondes de repos entre chaque sonication et en prenant garde que la sonde soit au centre du tube et de la suspension cellulaire. Le sonicateur est réglé à une amplitude de 39%
- Cette étape doit être réalisée juste avant le dosage.

**Technique :**

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en verre :

Réactifs	Volume (µl)
Tampon G2	200
Eau ppi	655

- Incuber 3 minutes à 37°C
- Ajouter 500.000 cellules soit 125 µl
- Démarrer la réaction en ajoutant 30 µl de NADH 2 mM soit 60 µM final
- Suivre la variation d'absorbance à 340 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre pendant 90 secondes.

- Faire le même dosage avec 10 µl d'oligomycine 1 mg/ml dans le milieu réactionnel soit 10 µg/ml final
- La variation de densité optique par minute est mesurée avec et sans oligomycine et l'activité enzymatique en nmol de NADH oxydé/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Activité spécifique : AS} = \frac{(\Delta\text{DO}^{-\text{Oligo}} - \Delta\text{DO}^{+\text{Oligo}})}{l \times \epsilon_{\text{NADH}} \times c \times S_{\text{NADH}}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

ΔDO<sup>-Oligo</sup> : variation de densité optique par minute à 340 nm mesurée sans oligomycine

ΔDO<sup>+Oligo</sup> : variation de densité optique par minute à 340 nm mesurée avec oligomycine

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε<sub>NADH</sub> : coefficient d'extinction molaire du NADH à 340 nm = 6,22 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

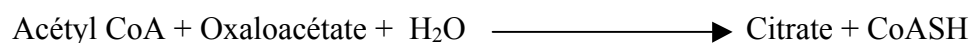
S<sub>NADH</sub> : nombre stoechiométrique du NADH dans l'équation de la réaction, soit : 1

q<sub>cellules</sub> : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,5

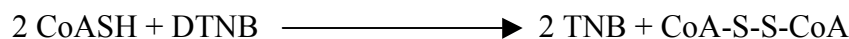
## Fiche Technique n°10 : Dosage de l'activité de la Citrate synthase (CS) sur fibroblastes

La citrate synthase (CS) est une enzyme clé du cycle de l'acide citrique (cycle de KREBS) se déroulant dans la matrice mitochondriale. Elle est spécifique aux mitochondries et le dosage de son activité est généralement utilisé comme un marqueur enzymatique quantitatif reflétant le contenu cellulaire en mitochondries (Jackman and Willis, 1996; Kirby et al., 1999).

Cette enzyme catalyse la formation de l'acide citrique à partir de l'acétyl-CoA et de l'oxaloacétate.



Le dosage est réalisé grâce à l'utilisation de l'acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) ou DTNB. Le CoASH issu de la réaction catalysée par la citrate synthase va réagir avec le DTNB pour former du trinitrobenzène (TNB). Le dosage consiste à mesurer la formation du trinitrobenzène (TNB).



### **Réactifs :**

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) 20 mM
  - EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 1 M, pH 8,1
- DTNB (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mM
- Acétyl CoA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- Triton 100X (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 %
- Oxaloacétate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM

### Préparation des cellules :

Les cellules sont préparées par congélation-décongélation comme pour les complexes II, III et IV pour normaliser les activités de ces complexes (CS1). Elles sont préparées par congélation-décongélation puis sonication pour les complexes I et V pour normaliser les activités de ces complexes (CS2).

### Technique :

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en plastique :

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
<b>DTNB 1 mM</b> (repris dans le tampon Tris)	150	150 µM
<b>Oxaloacétate 10 mM</b>	50	500 µM
<b>Acétyl CoA 10 mM</b>	30	300 µM
<b>Triton 10%</b>	10	0,1%
<b>Eau ppi</b>	755 (CS1) 735 (CS2)	

- Incuber 2 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 100.000 cellules soit 5 µl (CS1) ou 25 µl (CS2)
- Suivre la variation d'absorbance à 412 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre pendant 90 secondes.
- La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de TNB formé/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Activité spécifique : } AS = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{\text{TNB}} \times S_{\text{TNB}}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

ΔDO: variation de densité optique par minute à 412 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε<sub>TNB</sub>: coefficient d'extinction molaire du TNB à 412 nm = 13,6 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

S<sub>TNB</sub>: nombre stoechiométrique du TNB dans l'équation de la réaction, soit : 1

q<sub>cellules</sub> : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,1

## Fiche Technique n°11 : Dosage de l'activité Aconitase sur fibroblastes

L'aconitase est une enzyme du cycle de l'acide citrique. Cette protéine catalyse la réaction d'interconversion du citrate en isocitrate *via* le cis-aconitate. Le dosage consiste à mesurer le cis-aconitate absorbant à 240 nm. Cette technique est adaptée de celle décrite par Krebs and Holzach (1952).

Cette enzyme contient un centre fer-souffre ce qui fait que son activité est sensible aux espèces réactives de l'oxygène. Une baisse d'activité sera donc un indicateur indirect de la production de ROS.

### Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) 20 mM
  - EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon Tris-HCl (*Eurobio, Paris, France*) : 100mM pH7,4
- MnCl<sub>2</sub> (Chlorure de manganèse) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10mM
- Isocitrate de sodium (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M
- Triton (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 %

### Technique :

Préparer dans des tubes à hémolyse en plastique contenant :

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
Tampon Tris 100 mM, pH 7,4	495	50 mM
Chlorure de Manganèse 10 mM	50	500 µM
Isocitrate de sodium 0,5 M	200	100 mM
Triton 10 %	10	0,1%
Eau ppi	220	

- Incuber 5 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 25 µl de cellules soit 500.000

- Suivre la variation d'absorbance dans une cuve en quartz à 240 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre pendant 240 secondes
- La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de cis-aconitate/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Activité spécifique : } AS = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{ACO} \times S_{n_{ACO}}} \times \frac{10^3}{q_{cellules}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

ΔDO: variation de densité optique par minute à 240 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε<sub>ACO</sub>: coefficient d'extinction molaire du cis-aconitate à 240nm = 3,6 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

S<sub>n<sub>ACO</sub></sub> : nombre stoechiométrique du cis-aconitate dans l'équation de la réaction, soit : 1

q<sub>cellules</sub> : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,5



## Fiche Technique n°12 : Dosage de l'activité Fumarase sur fibroblastes

La fumarase (ou fumarate hydratase), est une enzyme du cycle de l'acide citrique. Elle catalyse l'hydratation du fumarate en L-malate qui est une réaction réversible. Ainsi, en présence de malate, la fumarase produit du fumarate absorbant à 250 nm. Cette technique est adaptée de celle décrite par Hill (1969).

### Réactifs :

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) 20 mM
  - EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH7,4
- EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM, pH7,4
- Malate (repris dans le KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,5 M, pH7,4
- Triton (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 %

### Technique :

Le mélange réactionnel est préparé dans des tubes en verre :

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
<b>Tampon Phosphate 100 mM, pH 7,4</b>	845	85 mM
<b>EDTA 10 mM, pH 7,4</b>	10	0,1 mM
<b>Malate 0,5 M</b>	100	50 mM
<b>Triton 10 %</b>	20	0,2%

- Incuber 5 minutes à 37°C
- Démarrer la réaction en ajoutant 25 µl de cellules soit 500.000
- Suivre la variation d'absorbance dans une cuve en quartz à 250 nm et à 37°C contre le blanc au spectrophotomètre pendant 240 secondes
  - La variation de densité optique par minute est mesurée et l'activité enzymatique en nmol de fumarate/minute/million de cellules est déterminée selon la formule suivante :

**Activité spécifique :**

$$AS = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{FUM} \times S_{n_{FUM}}} \times \frac{10^3}{q_{cellules}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

$\Delta DO$ : variation de densité optique par minute à 250 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

$\epsilon_{FUM}$ : coefficient d'extinction molaire du fumarate à 250nm = 4,88 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

$S_{n_{FUM}}$  : nombre stoechiométrique du fumarate dans l'équation de la réaction, soit : 1

$q_{cellules}$  : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 0,5

## **Fiche Technique n°13 :** **Dosage de l'isocitrate déshydrogénase sur fibroblastes**

Il existe plusieurs isoenzymes selon les compartiments cellulaires, dont une forme mitochondriale à  $\text{NAD}^+$  qui participe au cycle de KREBS. Les isocitrate déshydrogénases sont des enzymes qui oxydent l'isocitrate en  $\alpha$ -cétoglutarate. Simultanément le NADP et la NAD sont réduits en NADPH et NADH absorbant à 340 nm.

### **Réactifs :**

- Tampon A (tampon de resuspension des cellules)
  - Saccharose (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 250 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 20 mM
  - EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2 mM
  - BSA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1 mg/mlAjuster à pH 7,2
- Tampon  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 100 mM, pH 7,2
- EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 mM
- $\text{CaCl}_2$  (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 20 mM
- Triton 100X (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 10 %
- Dithiothreitol (DTT) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 20 mM
- $\text{NAD}^+$  (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 8 mM
- $\text{MgCl}_2$  (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 1M
- NADP (*Roche, Rosny-sous-bois, France*) : 80 mM
- Isocitrate de sodium (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 500 mM

### **Technique :**

- Décongeler les cellules à température ambiante
- Reprendre le culot par 50  $\mu\text{l}$  de tampon A par million de cellules

- Dans des tubes en verre préparer :

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 100mM, pH 7,2</b>	60	10 mM
<b>CaCl<sub>2</sub> 20 mM</b>	60	2 mM
<b>EDTA 10 mM</b>	12	200 µM
<b>Triton 10X</b>	6	0,1%
<b>DTT 20 mM</b>	60	2 mM
<b>NAD 8 mM</b>	60	800 µM
<b>MgCl<sub>2</sub> 1M</b>	6	10 mM
<b>NADP 80 mM</b>	6	800 µM
<b>Eau ppi</b>	274	

- Ajouter 50 µl de cellules (1million)
- Incuber 5 min à 37°C
- Débuter la réaction en ajoutant 12 µl d'isocitrate de sodium 500 mM soit une concentration finale de 10 mM
- Lire sur 3 min à 340nm

$$\text{Activité spécifique : } AS = \frac{(\Delta DO)}{l \times \epsilon_{\text{NADH}} \times S_{\text{NADH}}} \times \frac{10^3}{q_{\text{cellules}}}$$

AS (cell) : Activité spécifique en nmol.min<sup>-1</sup>.mg de prot.<sup>-1</sup>

ΔDO: variation de densité optique par minute à 250 nm

l : longueur de traversée du faisceau optique en cm, soit : 1

ε<sub>NADH</sub>: coefficient d'extinction molaire du NADH et du NADPH à 340 nm = 6,22 mM<sup>-1</sup>.cm<sup>-1</sup>

S<sub>NADH</sub> : nombre stoechiométrique du fumarate dans l'équation de la réaction, soit : 1

q<sub>cellules</sub> : quantité de cellules ajoutée dans le mélange réactionnel en million, soit : 1

- L'activité d'ICDH obtenue est rapportée à celle de la citrate synthase

## **Fiche Technique n°14 :** **Extraction d'ARN de fibroblastes**

L'extraction des ARN est réalisée avec le Kit Qiagen « RNeasy » (*Qiagen, Courtaboeuf, France*). Cette technique repose sur l'accrochage sélectif des ARN totaux sur une colonne de silice. L'utilisation d'un tampon fortement concentré en sels permet l'accrochage de plus de 100 µg d'ARN d'une taille pouvant atteindre 200 bases. Une première étape consiste à lyser mécaniquement les cellules puis à inhiber les RNases dans un tampon de guanidine thiocyanate très dénaturant. Les lysats sont alors déposés sur colonne de silice et les ARN sont retenus alors que les contaminants sont élués. Enfin, les ARN sont décrochés de la colonne et élués.

### **Technique :**

#### ***1- Lyse des cellules***

- Mettre 10µl/mL de β-mercaptoethanol dans du tampon RLT contenant du thiocyanate de guanidium
- Prendre un culot sec de fibroblastes (< 5.10<sup>6</sup> cellules)
- Mettre 350µl de tampon RLT contenant du β-mercaptoethanol dans le tube contenant le culot cellulaire
- Vortexer le tube jusqu'à décongélation du culot
- Mettre le tout dans une colonne violette
- Centrifuger 2 minutes à 10000 g

#### ***2-Extraction des ARN totaux***

- Enlever la colonne et ajouter 1 volume d'éthanol 70% (350 µl) dans l'éluât
- Mettre l'éluât dans une colonne rose RNeasy
- Centrifuger 15 secondes à 10000g et éliminer l'éluât
- Ajouter 350µl de tampon RW1 contenant une petite quantité de thiocyanate de guanidium dans la colonne rose
- Centrifuger 15secondes à 10000g et éliminer l'éluât
- Ajouter 80µl de DNase (10µl de DNase + 70µl de tampon RDD) dans la colonne rose et incuber 15 minutes à température ambiante
- Ajouter 350µl de tamon RW1
- Centrifuger 15 secondes à 10000g et éliminer l'éluât
- Faire un lavage en ajoutant 500µl de tampon RPE pour éliminer les contaminants

- Centrifuger 15 secondes à 10000g et éliminer l'éluat
- Faire un second lavage avec 500µl de tampon RPE
- Centrifuger 1min à vide à 16000g

### ***3-Elution des ARN totaux***

- Passer la colonne dans un tube eppendorf propre de 1,5mL
- Eluer les ARN totaux retenus dans la colonne avec 30µl d'eau RNase free
- Centrifuger 1 minute à vide à 10000g
- Récupérer l'éluat contenant les ARN et conserver à -80°C

### ***4-Mesure de la concentration en ARN***

● La densité optique des échantillons est lue avec un spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (*NanoDrop Technologies, Delaware, USA*) à 260 nm (longueur d'ondes d'absorption des bases puriques et pyrimidiques) et à 280 nm (longueur d'onde d'absorption des protéines) afin de s'assurer de la pureté des échantillons.

Sachant qu'une unité de densité optique correspond à 40 µg d'ARN simple brin, la concentration en ARN contenue dans les échantillons peut être calculée à partir de leur absorbance à 260 nm.

## **Fiche Technique n°15 :** **Transcription inverse d'ARN de fibroblastes**

La reverse transcription consiste à synthétiser de l'ADN à partir d'une matrice d'ARN. Cette étape est réalisée grâce à l'enzyme rétrovirale reverse transcriptase (MMLV : Moloney-Murine Leukemia Virus). Cette technique est réalisée grâce au kit Advantage® RT-for-PCR Kit (*Clontech, Saint-Germain-en-Lay, France*).

### **Technique :**

- Mettre 1µg de l'ARN préalablement extrait qsp 12,5 µl d'eau « RNase free » en présence de 1µl d'hexamères soit 1µM final.
- Placer le tube est alors placé au bain-marie sec pendant 2 minutes à 70°C.
- Ajouter successivement :
  - 4µl du tampon 5X (250mM Tris-HCl (pH 8,3), 375mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>)
  - 1µl du mix de dNTP (500 µM de chaque dNTP)
  - 0,5 µl de RNAsin (inhibiteur de ribonucléases) soit 20 unités
  - 1 µl de MMLV reverse transcriptase soit 200 unités
- Placer le tube dans un thermocycleur pendant 1 heure à 42°C puis 5 min à 95°C
- Diluer en ajoutant 80 µl d'eau stérile
- Conserver les ADNc synthétisés à -80°C.

## **Fiche Technique n°16 :** **RT-PCR Quantitative**

Cette technique permet l'amplification de la séquence d'ADN cible et la quantification de l'amplicon formé grâce à l'utilisation d'une sonde fluorescente. La sonde fluorescente utilisée lors de ces manipulations est le SYBR green 1 qui se lie à toutes les molécules d'ADN double brin en émettant une fluorescence détectable à 521 nm. La fluorescence émise, détectée par un spectrofluorimètre, sera proportionnelle à la quantité d'ADN double brin synthétisé.

### **Technique :**

Les transcrits des gènes GDAP1 et  $\beta$ 2 microglobuline sont quantifiés par PCR quantitative en temps réel grâce au thermocycleur Chromo 4 real-time PCR detector et au kit iQ Sybr green Supermix (BioRad, CA, USA).  $\beta$ 2 microglobuline sert de gène de référence pour normaliser la quantité d'ADNc de chaque échantillon.

### ***1-Préparer une gamme de référence pour chaque gène***

Afin de pouvoir analyser de manière quantitative l'amplification du gène d'intérêt, il est nécessaire d'établir au préalable une gamme de nombre de copies connues d'amplicons du gène cible. Pour cela, une PCR classique est réalisée : 2  $\mu$ l d'ADNc sont ajoutés à 15  $\mu$ l d'un mélange d'amorces (2 $\mu$ l d'amorces sens et antisens à 20 mM chacune et 11  $\mu$ l d'eau) et à 23  $\mu$ l du mélange de PCR (4  $\mu$ l de tampon 10X, 2,5  $\mu$ l de  $MgCl_2$  à 25 mM, 4 $\mu$ l de dNTP à 2 mM, 12  $\mu$ l d'eau DEPC et 0,5  $\mu$ l de l'enzyme Taq polymerase). Les ADNc sont d'abord dénaturés à 94°C pendant 3 minutes puis 35 cycles de dénaturation 94°C 30 secondes, hybridation au  $T_m$  du couple d'amorces 30 secondes, élongation à 72°C pendant 30 secondes et enfin 72°C pendant 10 minutes. Les ADN amplifiés sont purifiés sur colonne (*High Pure Product Purification kit, Boeringher*) et sont quantifiés à la fois par lecture de la densité optique des ADN double brin à 260 nm et par quantification sur gel d'agarose à 2,5%.

Le nombre de copies dans les échantillons est calculé grâce à la formule suivante :

Nombre de copies = DO (ng/ $\mu$ l) \* 9,1. 10<sup>11</sup> / nombre de paires de bases du produit de PCR

Les échantillons sont dilués pour obtenir 10<sup>10</sup> copies/ $\mu$ l. La gamme est ensuite réalisée par dilutions en cascade de cet échantillon à 10<sup>10</sup> copies/ $\mu$ l dans de l'eau stérile.



## ***2-PCR quantitative en temps réel***

Mettre dans une barette adaptée au Chromo 4 real-time PCR detector :

- 8 µl de cDNA issu de la réverse transcription et dilué au 1/40<sup>ème</sup> (1/100<sup>ème</sup> final)
- 1 µl d'amorce sens (0,5 µM final)
- 1 µl d'amorce anti-sens (0,5 µM final)
- 10 µl de mix 2X contenant l'enzyme Taq DNA polymerase et le fluorochrome

Les séquences des amorces utilisées sont les suivantes :

<b>Gènes</b>	<b>Amorces</b>	<b>Taille des amplicons</b>
GDAP1 (primer 1)	Amorce sens : 5'-TGGCTGCATTTTACATCCTG-3' Amorce antisens : 5'-AAATCTGGGTTTTCTTCAGCA-3'	129 pb
GDAP1 (primer 2)	Amorce sens : 5'-ACCCAGGTTAATGCCTGATA-3' Amorce antisens : 5'-CTGGGTTTTCTTCAGCAAGT-3'	221 pb
β2-microglobuline	Amorce sens : 5'-TTGTCTTTCAGCAAGGACTG-3' Amorce antisens : 5'-AAAGTCACATGGTTCACACG-3'	110 pb

Le programme d'amplification utilisé est le suivant :

- 95°C pendant 3 min, puis :
- Dénaturation :
  - Température : 95°C
  - Temps d'incubation : 15s
- Hybridation :
  - Température : 57°C
  - Temps d'incubation : 40s
- Retour à l'étape de dénaturation : nombre de cycles : 39 cycles
- « Melting curves » de 62° à 95°C
- Fin

## Fiche Technique n°17 : Western Blot

Cette technique permet de déterminer la présence ainsi que la quantité d'une protéine contenue dans un échantillon. Elle est basée sur la reconnaissance d'un motif antigénique d'une protéine par un anticorps primaire. Cet anticorps est à son tour reconnu par un anticorps secondaire couplé à la peroxydase. La révélation du complexe antigène/anticorps primaire/anticorps secondaire se fait par chimioluminescence.

### Milieus et Réactifs :

- Tampon Tris SDS pH 8,8 (Stocké à 4°C)
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 1 M
  - SDS (*Eurobio, Paris, France*) : 0,2 %Ajuster à pH 8,8
  
- Tampon Tris SDS pH 6,8 (Stocké à 4°C)
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 325 mM
  - SDS (*Eurobio, Paris, France*) : 0,2 %Ajuster à pH 6,8
  
- Tampon échantillon -2X
  - Tris-HCl (*Eurobio, Paris, France*) : 0,4 M
  - SDS (*Eurobio, Paris, France*) : 4,5 %
  - Glycérol (*Eurobio, Paris, France*) : 4,5 %
  - Bleu de bromophénol (*Eurobio, Paris, France*) : 2 mM
  - $\beta$ -mercaptoéthanol (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,6 MAjuster à pH 6,8
  
- Tampon électrophorèse
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 25 mM
  - Glycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 192 mM
  - SDS (*Eurobio, Paris, France*) : 0,1 %Amener à pH 8,3

- Tampon de transfert
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 20 mM
  - Glycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 150 mM
  - Ethanol : 20 %
 Amener à pH 8,3
- Tampon TBS
  - NaCl (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,2 M
  - KCl (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 2,5 mM
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 25 mM
 Amener à pH 7,4

### Technique :

#### *1-Préparation des gels*

- Les gels sont coulés entre des plaques de verre fixées sur un support et un peigne est enchâssé entre ces plaques (*système Miniprotean, Biorad, CA, USA*).
- Préparer le gel de séparation (pour 2 gels) :

Réactifs	Gel à 12,5%	Gel à 8%
<b>H<sub>2</sub>O</b>	2 ml	5,7 ml
<b>Tampon Tris-SDS pH 8,8</b>	12,5 ml	12,5 ml
<b>30 % Acrylamide/Bis solution 29 :1</b>	10,4 ml	6,7 ml

- Ajouter 250 µl de persulfate d'ammonium à 10% et 12,5 µl de TEMED
- Couler le gel et laisser polymériser 30 min. à température ambiante
- Couler le gel de concentration (pour 2 gels) :

Réactifs	Quantité
<b>H<sub>2</sub>O</b>	4 ml
<b>Tampon Tris-SDS pH 6,8</b>	5 ml
<b>30 % Acrylamide/Bis solution 29 :1</b>	1,2 ml

- Ajouter 100 µl de persulfate d'ammonium à 10% et 10 µl de TEMED
- Couler le gel, insérer les peignes et laisser polymériser 30 min. à température ambiante

## ***2-Préparation des échantillons***

- Les Western-blots ont été réalisés à partir de culots secs de fibroblastes ( $> 3.10^6$  millions de cellules).
- Les culots sont repris dans de l'eau (10  $\mu$ l/million).
- 5  $\mu$ l d'échantillon sont dilués au 1/20 ème dans du NaCl (95  $\mu$ l)
- Le dosage des protéines est réalisé selon la procédure décrite précédemment.
- Chaque échantillon à déposer pour les western-blots contient entre 20 et 40  $\mu$ g de protéines totales.
- Les échantillons sont dilués au 1/2 dans du tampon échantillon 2X (le volume d'échantillon prélevé dépend de la quantité de protéines totales voulue en fonction de la protéine ciblée).
- Les protéines sont ensuite dénaturées par chauffage au bain sec 5 minutes à 50°C ou 100°C.
- Les tubes sont enfin picofugés.

## ***3-Électrophorèse sur gel de polyacrylamide en présence de SDS***

- Les protéines sont ensuite séparées par migration en gel SDS-PAGE (« Sodium-Dodecyl-Sulfate-Polyacrylamide Gel »).
- Déposer un volume d'échantillon correspondant à 50  $\mu$ g de protéines cellulaires ou 10  $\mu$ g de protéines mitochondriales dans les puits d'un gel de polyacrylamide à 12,5% ou 8% selon la taille des protéines d'intérêt.
- Déposer un standard protéique de masse moléculaire connue afin d'étalonner la migration des protéines et d'estimer leur masse moléculaire.
- Migrer dans une cuve contenant du tampon électrophorèse à 100 volts pendant 10 minutes afin de concentrer les échantillons dans le gel de concentration puis à 140 volts pendant 1h45 pour 2 gels ou 150 V pour 4 gels pour séparer les échantillons.

## ***4-Transfert sur membrane de nitrocellulose***

- Les protéines sont transférées à partir du gel d'électrophorèse sur une membrane de nitrocellulose en appliquant un faible courant.
- Préparer la membrane de nitrocellulose par immersion dans trois bains successifs d'éthanol, d'eau puis de tampon de transfert
- Placer la membrane dans l'appareil de transfert au contact du gel entre des feuilles de papier Whatman imbibées dans le même tampon.
- Appliquer un courant de 260mA pendant 1 heure 30 pour 2 gels, 1h45 pour 4 gels.

### **5-Incubation avec les anticorps**

- Saturer la membrane 1h à température ambiante sous agitation ou toute la nuit à 4 °C dans du TBS 1X, Tween-20 0,1%, lait 5%.
- Laver 1 fois 5 min. dans du TBS 1X, Tween-20 0,1%
- Incuber la membrane dans l'anticorps primaire correspondant à la protéine d'intérêt, pendant 2h à température ambiante sous agitation. L'anticorps est dilué dans du TBS 1X, Tween-20 0,1%, lait 1%.

<b>Protéine Cible</b>	<b>Taille</b>	<b>Dilution</b>	<b>Provenance</b>
OXPPOS (V : V $\alpha$ , III : core2, II : SDHB, IV : COX II, I : 20kDa)	55, 47, 30, 26, 20 kDa	1/500	Mitosciences, Oregon, USA
VDAC	30 kDa	1/1000	Mitosciences, Oregon, USA
GDAP1	42 kDa	1/1000	Abnova, Taipei, Taiwan
GDAP1	42 kDa	1/500	Santa Cruz Biotechnologies, CA, USA
SIRT1	120 kDa	1/1000	Cell Signaling technology, Beverly, MA, USA
SIRT3	28 kDa	1/1000	Cell Signaling technology, Beverly, MA, USA
MnSOD	24 kDa	1/1000	Abcam, Cambridge, UK
$\alpha$ -tubuline	55 kDa	1/10 000	Sigma, St Louis, MO, USA

Rq : les anticorps anti-GDAP1 utilisés ne semblent pas spécifiques de GDAP1 car lorsqu'ils ont été utilisés sur les échantillons d'un patient porteur d'une mutation tronquante p.Q163X, le western-blot n'a pas mis en évidence de diminution de quantité de la protéine alors que les qPCR ont montré une nette diminution de l'ARNm.

- Laver 3 fois 5 min. dans du TBS 1X, Tween-20 0,1%
- Incuber la membrane pendant 1h à température ambiante sous agitation dans l'anticorps secondaire de lapin anti-souris conjugué à la peroxidase et dilué au 1/10000ème dans du TBS 1X, Tween-20 0,1% (pour les anticorps anti-OXPPOS, VDAC, MnSOD,  $\alpha$ -tubuline et anti-GDAP1 (abnova)) ou anti-lapin dans les mêmes conditions (pour les anticorps anti-SIRT1, SIRT3 et GDAP1 (Santa Cruz)).
- Laver 3 fois 5 min dans du TBS 1X, Tween-20 0,1%

### **6-Révélation**

- Incuber pendant 5 minutes dans le réactif de révélation par chimioluminescence ECLPlus<sup>TM</sup> (Amersham Biosciences, UK) constitué de 2 ml de réactif A + 50  $\mu$ l de réactif B.

- Faire une capture du signal et quantifier l'intensité des bandes obtenues grâce à l'imageur « Molecular Imager ChemiDoc XRS System » (Biorad) et au logiciel d'analyse « Quantity One 1-D Analysis Software ».

## **Fiche Technique n°18 :** **Blue Native-Page à partir de fibroblastes**

Cette technique permet de tester l'assemblage des complexes I, IV et V.

Elle est adaptée de Schagger (1995) et Schagger and Pfeiffer (2000)

### **Milieux et Réactifs :**

- AC/BT :
  - Acide 6-aminocaproïque (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1,5 M
  - BisTris (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 75 mM
  - eau distillée qsp 25 mlAmener le pH à 7
- Tampon de charge :
  - Bleu de Coomassie G250 (*Biorad, CA, USA*) 5%
  - Acide 6-aminocaproïque (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 750 mM
  - EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 0,5 mM
  - BisTris (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mM
  - Eau distilléeAmener le pH à 7
- Mix antiprotéase 25 X (*Roche, Rosny-sous-bois, France*):
  - dissoudre une pastille dans 2 ml d'eau distillée
- Digitonine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 25 mg/ml et 4 mg/ml
- Laurylmaltoside (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 125 mM
  - dissoudre la poudre du flacon (100mg) avec ce l'eau distillée
- Laurylmaltoside (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 62,5 mM
  - diluer au 1/2 la solution précédente
- PBS 10X (*Eurobio, Paris, France*) : diluer au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'eau
- Tampon anode :
  - BisTris (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mM
  - Eau distillée qsp 5000 mlAmener le pH à 7

- Tampon Cathode A :
  - BisTris (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 15 mM
  - Tricine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mM
  - Bleu de Coomassie (*BioRad, CA, USA*) : 0,02%
  - Eau distillée qsp 2000 ml
 Amener le pH à 7
- Tampon Cathode B :
  - BisTris (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 15 mM
  - Tricine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mM
  - Eau distillée qsp 2000 ml
 Amener le pH à 7
- Marqueur Ferritine type I (*Sigma Aldrich, Lyon, France*)
- Tampon Towbin :
  - Tris-base (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 25 mM
  - Glycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 192 mM (à solubiliser dans une peu d'eau distillée), puis
  - Méthanol 20 % vol/vol 1l
  - Eau distillée qsp 5000 ml
- Méthanol
- TBS 10X :
  - NaCl 1369 mM
  - KCl (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) 26,9 mM
  - Tris-base 248 mM
  - Eau distillée qsp 1000 ml
 Amener le pH à 7,4
- TBS 1X :
  - Diluer le TBS 10X au 1/10<sup>ème</sup> avec de l'eau distillée
- TBS 1X/ 0,1% tween :
  - Ajouter 1 ml de tween 20 (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) par litre de TBS1X
- Lait écrémé en poudre Régilait
- Gels précoulés 3%-12% (*Invitrogen, Carlsbad, CA, USA*)



## **Technique :**

### ***1-Préparation des échantillons***

- Les BN-Page ont été réalisés à partir de culots secs de fibroblastes ( $> 7.10^6$  millions de cellules).
- Reprendre les culots par du PBS 1X (100  $\mu$ l/ 7 millions).
- Ajouter 100  $\mu$ l de digitonine 4 mg/ml pour 7 millions de cellules et incuber 10 min à 4°C sous agitation régulière
- Stopper la réaction en ajoutant 1 ml de PBS 1X
- Centrifuger 10 min à 10000g à 4°C
- Retirer le surnageant et laver le culot avec 1ml de PBS 1X
- Prendre 15  $\mu$ l d'homogénat cellulaire pour le dosage des protéines en diluant au  $\frac{1}{2}$  dans du NaCl selon la méthode décrite précédemment
- Centrifuger 10 min à 10000g à 4°C
- Retirer le surnageant et reprendre le culot par du tampon AC/BT + antiprotéase 1X (5mg de protéine/ml de tampon)
- Conserver à -80°C

### ***2-Traitement des échantillons pour BN page du Complexe I***

- Décongeler la suspension cellulaire de mitochondries à 5mg/ml
- Prélever dans un tube à casquette 8  $\mu$ l soit 40  $\mu$ g de protéines
- Ajouter 32  $\mu$ l de Tampon AC/BT/antiprotéase 1X pour qsp 40  $\mu$ l
- Recongeler le reste à -80°C
- Ajouter 1,9  $\mu$ l de Laurylmaltoside 125 mM (soit 3g/g de protéines mitochondriales)
- Vortexer brièvement et incuber 10 min à 4 °C
- Centrifuger 20 min à 4°C à 16000g
- Après centrifugation, récupérer le surnageant et ajouter 2,5  $\mu$ l de tampon de charge
- Vortexer
- Charger l'ensemble sur les gels précoulés
- Préparation du marqueur Ferritine 5  $\mu$ l et ajouter 2,5  $\mu$ l de tampon de charge

### ***3-Migration des échantillons***

- Remplir le réservoir entre les gels avec du tampon cathode A, puis le bac avec du tampon anode
- Rincer chaque puit par du tampon cathode A

- Charger les échantillons et le marqueur sur les gels
- La migration se fait à 4°C en chambre froide
- Brancher le générateur Bio-rad
- Faire une première migration à 50V pendant 30 min de manière à ce que les échantillons aient dépassé le fond des puits
- Ensuite, faire migrer 45 min à 7,5 mA/gel (ampérage constant)
- Remplacer le tampon cathode A par du tampon cathode B dans le réservoir entre les gels
- Poursuivre la migration à 7,5 mA/gel (voltage saturant : 300 V).

#### ***4-Transfert***

- Vider la cuve avant le démontage
- Préparer 2 bacs : un bac avec du méthanol et l'autre avec du tampon Towbin
- Couper une membrane Hybond à la dimension du gel
- Imbiber la membrane 15 s dans du méthanol avant de la mettre à équilibrer dans du tampon Towbin
- Imbiber 2 papiers Whatman (Thick Blot Paper) et 2 éponges dans le tampon Towbin
- Placer successivement :
  - une éponge au contact de la cathode noire
  - un papier Whatman
  - le gel
  - une membrane
  - un papier Whatman
  - une éponge au contact de l'anode rouge
- Installer le tout dans la cassette de la cuve en plaçant la plaque de transfert noire (cathode) contre la plaque noire de la cassette
- Mettre la cassette de transfert dans la cuve de transfert
- Remplir la cuve de transfert jusqu'à immersion totale de la cassette par du tampon Towbin
- Mettre la cuve dans une bassine remplie de glace
- Le transfert se fait à 4° C en chambre froide
- Brancher le générateur Bio-Rad
- Transférer 1h30 pour un gel, et 1h45 pour 2 gels à 100V
- A la fin du transfert, récupérer la membrane face transférée vers le haut et la mettre dans une boîte à hybridation

### **5- Saturation**

- Préparer la solution de saturation (TBS1X-Tween 0,1%-lait 10%)
- Verser doucement sur le bord de la boîte à hybridation
- Laisser toute la nuit sous agitation à 4°C

### **6-Hybridation (pour BN page complexe I)**

- Préparer l'anticorps primaire, 10 ml par membrane : (par ordre d'hybridation)

<b>Protéine Cible</b>	<b>Taille</b>	<b>Dilution</b>	<b>Provenance</b>
NDUFS3	30 kDa	1/500	Mitosciences, Oregon, USA
NDUFA9	39 kDa	1/1000	Mitosciences, Oregon, USA
NDUFB6	17 kDa	1/2000	Mitosciences, Oregon, USA
Sous-unité du complexe II (II 70Fp) (référence de charge)	70 kDa	1/2000	Mitosciences, Oregon, USA

- Rincer la membrane 3 fois 5 min avec du TBS1X-Tween 0,1%
- Mettre en contact l'anticorps primaire pendant 6h sous agitation
- Rincer la membrane 3 fois 5 min
- Préparer l'anticorps secondaire 1/10000 dans du TBS1X-Tween 0,1%
- Mettre l'anticorps secondaire pendant 2h sous agitation
- Rincer la membrane 3 fois 5 minutes dans du TBS1X-Tween 0,1% et une fois dans du TBS1X

### **7-Révélation**

- Incuber pendant 7 minutes dans le réactif de révélation par chimioluminescence ECLPlus™ (Amersham Biosciences, UK) constitué de 2 ml de réactif A + 50 µl de réactif B (pour un gel).
- Faire une capture du signal et quantifier l'intensité des bandes obtenues grâce à l'imager « Molecular Imager ChemiDoc XRS System » (Biorad) et au logiciel d'analyse « Quantity One 1-D Analysis Software ».

## Fiche Technique n°19 : Dosage des groupements thiols sur fibroblastes

Les groupements sulfhydryles ou thiols (-SH) sont présents dans la plupart des protéines. Leur présence dans les protéines est très importante, notamment parce qu'elle permet la formation des ponts disulfures. Le groupement thiol est très fragile et s'oxyde très facilement. Il s'agit donc d'un marqueur sensible du stress oxydatif lorsque leur quantité est diminuée. Le dosage est réalisé grâce à l'utilisation de l'acide 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoïque) (DTNB) ou réactif de Elmann. Le DTNB réagit avec les groupements SH en donnant des molécules de thionitrobenzoate (TNB) absorbant à 412 nm.

### Milieus et Réactifs :

- Tampon de lyse :
  - EDTA pH 7 (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 5mM
  - Antiprotéase 1X (*Roche, Rosny-sous-bois, France*)
  - Triton 10X (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,1%
- Tampon ThA :
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 8,3 (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,1M
  - EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1mM
  - SDS (*Eurobio, Paris, France*) : 5%
- Tampon ThB :
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> pH 7,2 (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 0,1M
  - EDTA (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 1mM
- KOH (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 5M
- DTNB (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 1mM repris dans du tampon ThA
- NADPH (*Roche, Rosny-sous-bois, France*): 5mM
- Glutathion reductase (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : réactif prêt à l'emploi
- Glutathion réduit et oxydé (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): repris dans du TCA, neutralisé juste avant l'emploi

### Technique :

#### *1-préparation des cellules*

- Trypsiner 2 T75 (environ 6.10<sup>6</sup> cellules)
- Reprendre avec du PBS1X/SVF 5% froid

- Réaliser un comptage cellulaire et centrifuger à froid à 800 rpm 5min
- Laver le culot avec 1 ml de PBS 1X froid et transférer rapidement dans un tube à casquette de 1,5 ml
- Centrifuger à froid à 800 rpm 5 min
- Reprendre le culot avec 20 µl de tampon de lyse par  $6 \cdot 10^6$  cellules
- Vortexer et mettre dans l'azote

### ***2- préparation du dosage sur cellules***

- Le jour du dosage, effectuer 2 congélations/décongélations dans l'azote (1 min dans l'azote, 1 min à 37°C)
- Précipiter les protéines avec 200 µl de TCA pur 6%
- Centrifuger 2min à 16000g
- Reprendre le culot avec 200 µl de tampon ThA
- Ajouter 1 à 2 µl de KOH dans le tube pour neutraliser (au papier pH)

### ***3- dosage***

- **Groupement protéique :**

- Tampon ThB : 850 µl
- DTNB : 100 µl
- 50 µl de cellules

Vortexer, incuber 15min à 37°C avant la lecture à 412 nm (blanc : 50 µl de tampon ThA)

## Fiche Technique n°20 : Traitement des fibroblastes en culture par Resvératrol

### Réactifs :

- Resvératrol (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : la poudre est reprise par de l'éthanol pur pour obtenir une solution finale à 219 mM, conservée à l'abri de la lumière, à -80°C
- Ethanol pur

### Technique :

- A partir de la solution mère à 219 mM, trois concentrations sont préparées :
  - 25 mM (100 µl de resvératrol dans 775 µl d'éthanol pur stérile),
  - 62,5 mM (100 µl de resvératrol dans 250 µl d'éthanol)
  - et 125 mM (100 µl de resvératrol dans 75 µl d'éthanol)sous la hotte, lumière éteinte. Les aliquotes sont conservés à -80°C et à l'abri de la lumière.
- 48h avant la confluence, le milieu de culture est changé et remplacé par une solution de resvératrol pour obtenir une concentration finale de :
  - 10 µM (2 µl de la solution à 25 mM dans 5 ml de milieu)
  - 25 µM (2 µl de la solution à 62,5 mM dans 5 ml de milieu)
  - 50 µM (2 µl de la solution à 125 mM dans 5 ml de milieu)
- Les cellules témoins sont traitées par de l'éthanol pur (« vehicle ») dilué au 1/2500<sup>ème</sup> (2 µl d'éthanol pur stérile dans 5 ml de milieu)
- Le traitement est laissé 48h puis les culots cellulaires sont réalisés pour les dosages enzymatiques, les études d'oxygraphie ou les western-blots.

Rq : Une courbe de croissance est effectuée pour chaque concentration, et seules les concentrations de resvératrol pour lesquelles un effet anti-prolifératif n'a pas été retrouvé seront utilisées pour les études. Dans notre cas, les concentrations 10 et 25 µM ont été utilisées pour les études.

## **Fiche Technique n°21 :**

### **Microscopie à épifluorescence sur fibroblastes en culture**

#### **Principe :**

Le microscope utilisé est un vidéomicroscope à fluorescence inversé (DMI6000B, Microsystems, Wetzlar, Germany) équipé d'une caméra (Roper Scientific, Tucson, AZ, USA). Il est composé d'une source de lumière à vapeur de mercure, permettant un éclairage puissant et stable dont le spectre de la lumière émise possède plusieurs pics utilisables pour exciter les fluorophores usuels (en utilisant des filtres pour sélectionner le pic choisi). Les filtres servent à sélectionner la gamme de longueur d'onde que l'on veut utiliser pour exciter les fluorophores ou que l'on veut récupérer pour obtenir une image. Dans le microscope, les filtres sont regroupés sur un cube qui comporte un filtre d'excitation et un filtre d'émission. On peut ainsi avoir plusieurs cubes avec, pour chaque, un jeu de filtres adaptés à un fluorophore particulier. Il suffit de changer le cube dans le chemin optique des faisceaux lumineux suivant le type de marquage effectué dans l'échantillon. Le principe de ce type de microscopie photonique est de marquer les molécules ou les structures d'intérêt avec une sonde fluorescente capable d'émettre elle-même de la lumière, de sorte que l'on observe principalement ce qu'on a choisi de marquer. Le reste de l'échantillon est noir ; ce qui permet un fort contraste. Lorsqu'une molécule fluorescente est excitée par un photon d'une énergie suffisante (avec la bonne longueur d'onde), elle se désexcite en émettant un photon d'énergie plus basse (à cause des relaxations d'énergie vibrationnelle).

Afin de corriger les aberrations optiques (dus aux objectifs, aux vibrations, à l'huile utilisée sur l'objectif 100X) un processus est utilisé : la déconvolution. Ce processus a pour but de ramener sur le plan focal toute la diffraction et ainsi d'obtenir des images moins floues. Ceci nécessite l'acquisition d'une pile d'images dans l'axe Z pour récupérer toute la diffraction au-dessus et au-dessous du plan focal afin d'avoir le maximum d'information de l'image.

#### **Fluorophores utilisés :**

- Mitotracker® Green ou Mitotracker® Red (*Molecular Probes, CA, USA*): Ces molécules ont la propriété de se fixer sur les membranes chargées des mitochondries.
- Hoechst 33342® qui se fixe spécifiquement aux bases adénine et thymine de l'ADN et émet une fluorescence bleue. Il diffuse librement à travers les membranes des cellules saines et apoptotiques.

- MITOSOX<sup>®</sup> (*Molecular Probes, CA, USA*), qui interagit spécifiquement avec les ROS « reactive oxygen species » d'origine mitochondriales en émettant dans le rouge.

Fluorophores	Concentration stock	Concentration finale	Durée et température d' incubation	Excitation/ émission (en nm)	Acquisition
<b>Mitotracker Red</b>	1mM (DMSO)	100 nm	10 min à 37°C	579/599	TRITC 500ms
<b>Mitotracker Green</b>	1mM (DMSO)	100 nm	10 min à 37°C	490/516	FITC 1000 ms
<b>Mitosox</b>	5mM (dans DMSO)	0.5µM (dans optimem)	10 min à 37°C	510/580	TRITC 500ms
<b>Hoechst</b>	10mg/ml (dans H <sub>2</sub> O)	10µg/ml (dans DMEM-F12, SVF 10%)	10 min à 37°C	350/461	DAPI 100ms

### **Préparation des échantillons :**

- Les cellules sont mises en culture dans des boîtes double-chambre (Labtek, Nunc International, Naperville, IL) pour l'étude du réseau mitochondrial, ou dans une boîte à 8 puits pour l'évaluation de la production de ROS. Les cellules des patients et des témoins sontensemencées dans du milieu DMEM F12-SVF 10% à raison de 30 000 cellules pour les double-chambre ou 15 000 cellules pour les chambres à 8 puits.

- **Pour l'étude du réseau mitochondrial :**

Après 48h, les préparations cellulaires sont observées au vidéomicroscope. Afin de visualiser les mitochondries, un fluorophore est utilisé Mitotracker<sup>®</sup> Green ou Mitotracker<sup>®</sup> Red (Molecular Probes, CA, USA. Pour la visualisation du noyau, un fluorophore bleu est ajouté (Hoechst<sup>®</sup>). Les cellules vivantes sont incubées pendant 10 min à 37°C avec le Mitotracker<sup>®</sup> et le Hoechst<sup>®</sup>. Puis, le milieu de marquage est éliminé des deux puits et remplacé par 1 mL de milieu OPTIMEM qui servira de milieu d'observation.

- **Pour l'évaluation de la production de radicaux libres :**

Après 48 heures de culture, le milieu de culture est remplacé pour la moitié des puits par un milieu contenant de l' H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> à la concentration de 250µM pendant une heure, puis par du milieu de culture sans H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pendant 3 heures. Dans les autres puits le milieu n'est pas

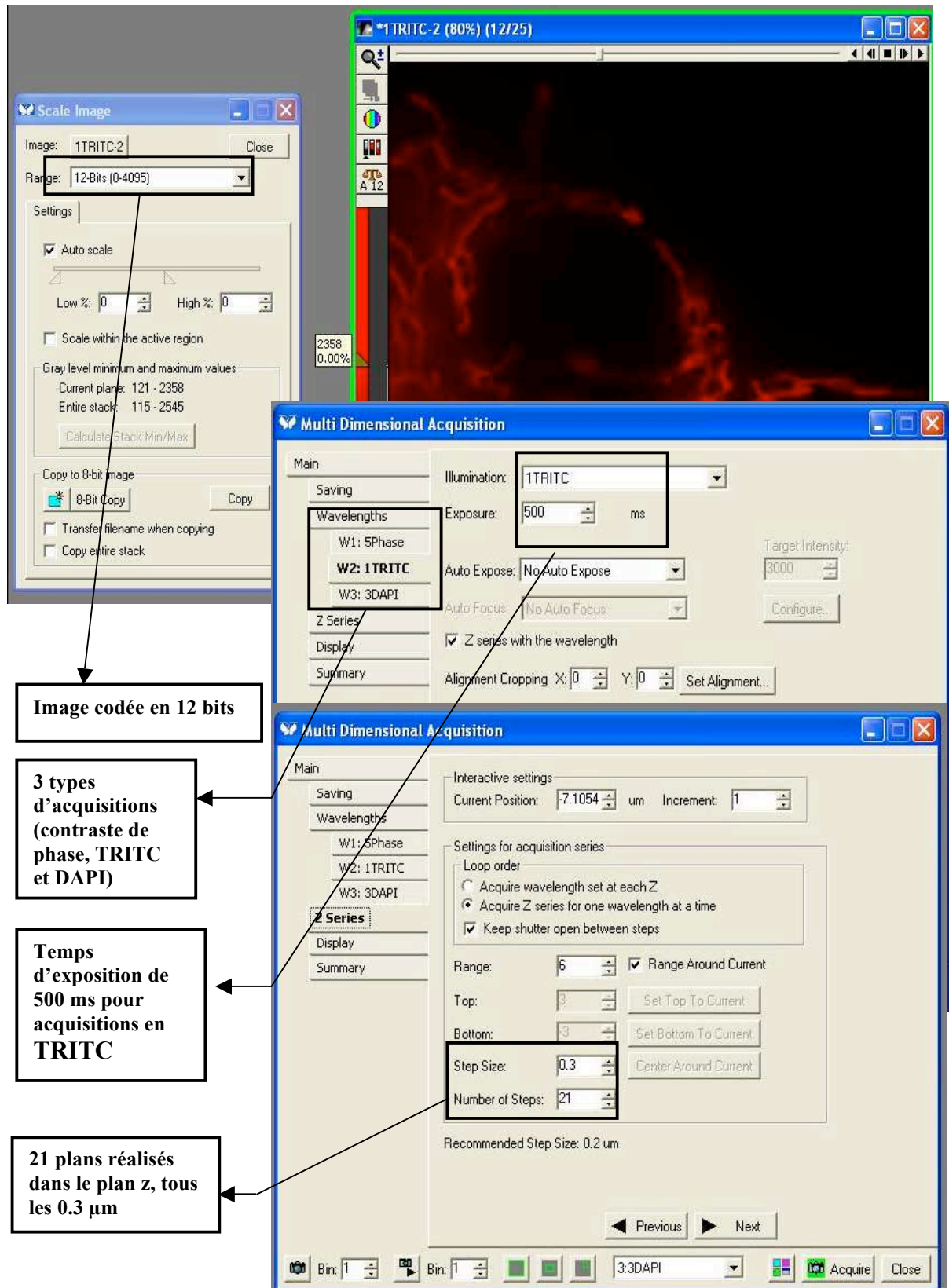


changé. Le milieu est ensuite éliminé de tous les puits et remplacé par un milieu de marquage contenant un fluorophore rouge, le MitoSox®.

### **Etude du réseau mitochondrial :**

La capture des images nécessite la réalisation de 21 plans d'acquisition (10 au-dessus et 10 au-dessous du plan focal). Trois types d'acquisitions sont réalisés: contraste de phase (durée d'exposition de 2ms) qui permet de visualiser les cellules dans leur ensemble et d'établir le plan focal ; TRITC (500ms) pour visualiser la fluorescence rouge des mitochondries et DAPI (100ms) pour visualiser en bleu les noyaux. Les différentes acquisitions doivent être codées sur 12 bits (0-4095). L'objectif utilisé est le 100X à immersion. Les acquisitions sont réalisées avec le logiciel Metamorph® 7.6 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). Au minimum, 50 acquisitions sont réalisées par puits.

Les images obtenues en TRITC sont déconvoluées afin de corriger les distorsions optiques et d'améliorer la qualité des images (réduction du bruit de fond), en utilisant un module de déconvolution se basant sur un algorithme de Meinel. Les images ainsi obtenues sont reconstruites en 3D. L'analyse des images est réalisée à l'aide du logiciel Imaris 6.3® (Bitplane, Zurich, Switzerland), permettant d'étudier la longueur des mitochondries, la fragmentation du réseau, l'état de connexions des mitochondries entre elles, la surface mitochondriale rapportée à la surface cellulaire.



**Image codée en 12 bits**

**3 types d'acquisitions (contraste de phase, TRITC et DAPI)**

**Temps d'exposition de 500 ms pour acquisitions en TRITC**

**21 plans réalisés dans le plan z, tous les 0.3 µm**

Quelques paramètres indispensables pour optimiser les images lors des acquisitions (logiciel METAMORPH)

### Evaluation de la production de radicaux libres :

Au moins 30 captures d'images comprenant 16 plans d'acquisition par lamelles sont réalisées au microscope à fluorescence (objectif 100X avec huile d'immersion). Deux types d'acquisition sont réalisés : en contraste de phase et en TRITC pour visualiser la fluorescence rouge.

Les images sont ensuite analysées par le logiciel Metamorph® 7.6 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA). L'ensemble des images a été déconvolué par des « batchs » de déconvolution avec le même algorithme de Meinel. L'image obtenue est reconstruite en 3D puis seuillée afin de visualiser les mitochondries. 80 régions de même dimension sont créées à partir du logiciel, 70 sont disposées au niveau des mitochondries les plus marquées et 10 sont disposées au niveau du bruit de fond dans le cytosol. Les données sont exportées dans Excel. Le bruit de fond est soustrait à l'intensité moyenne de la fluorescence permettant de comparer qualitativement et quantitativement la production de ROS mitochondriale des cellules des patients à celle du témoin.

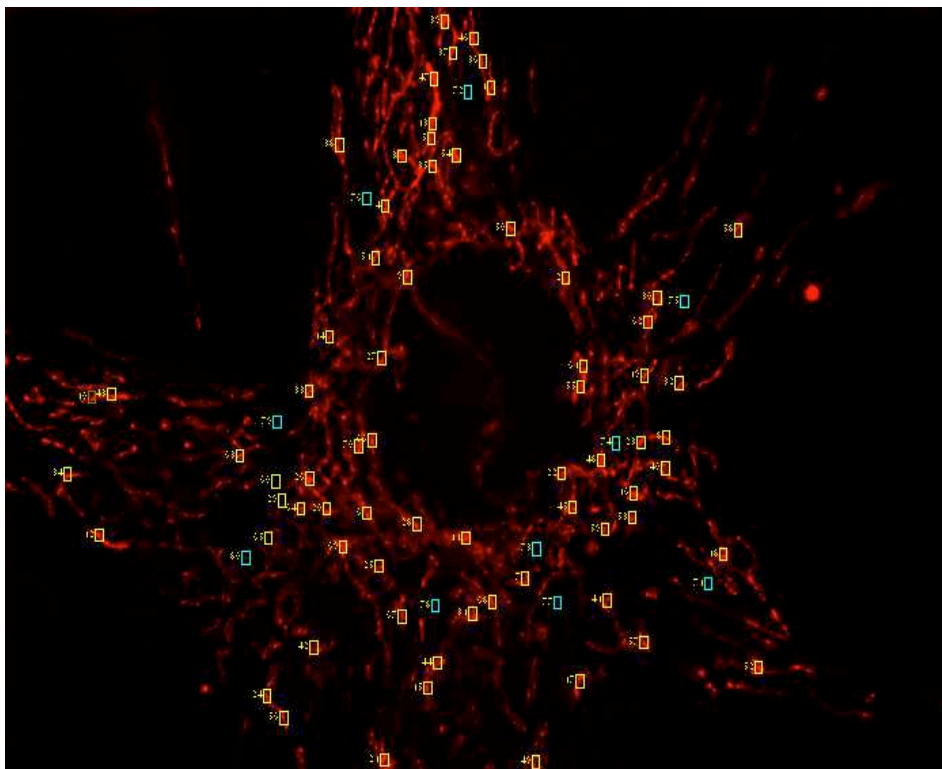


Image de microscopie à fluorescence analysée avec le logiciel Metamorph. Il s'agit d'une image déconvoluée d'une cellule fibroblastique traitée pendant 1 heure par de l' $H_2O_2$ , puis 3 heures sans  $H_2O_2$  puis incubée 15 min avec MitoSox®. Des régions jaunes sont disposées sur les mitochondries les plus marquées et des régions bleues disposées sur le bruit de fond.

## **Fiche Technique n°22 :** **Immunocapture du complexe I à partir de fibroblastes**

### **Milieux et Réactifs :**

- PBS 1X (*Eurobio, Paris, France*)
- Digitonine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 4mg/ml chauffée 2min à 95°C
- Antiprotéase 25X (*Roche, Rosny-sous-bois, France*)
- Laurylmaltoside (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 15 % (1,5g/10 ml de PBS 1X)
- Tampon d'éluion :
  - glycine (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 200mM
  - laurylmaltoside (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 1mM
  - Amener le pH à 2,5
- Tampon de lavage :
  - PBS 1X
  - laurylmaltoside 1 mM
- Tampon de neutralisation :
  - Tris (*Eurobio, Paris, France*) : 1M
  - DTT (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mM
  - Amener le pH à 8,5
- Tampon « phosphosafe » permettant de préserver les phosphorylations protéiques :
  - sodium fluoride (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 25 mM (final : 1mM)
  - sodium orthovanadate (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 50 mM ( final : 2mM)
  - Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) (*Sigma Aldrich, Lyon, France*): 200 mM (final : 1 mM)
- Tampon échantillon 2X
  - Tris-HCl (*Eurobio, Paris, France*) : 0,4 M
  - SDS (*Eurobio, Paris, France*) : 4,5 %
  - Glycérol (*Eurobio, Paris, France*) : 4,5 %
  - Bleu de bromophénol (*Eurobio, Paris, France*) : 2 mM
  - $\beta$ -mercaptoéthanol (*Sigma Aldrich, Lyon, France*) : 0,6 M
  - Ajuster à pH 6,8
- Anticorps d'immunocapture complexe I (*Mitosciences, Oregon, USA*)

## **Technique :**

### ***1-Préparation des échantillons***

- Les immunocaptures ont été réalisées à partir de culots secs de fibroblastes ( $> 7.10^6$  millions de cellules).
- Reprendre les culots par du PBS 1X (100  $\mu$ l/ 7 millions).
- Ajouter 100  $\mu$ l de digitonine 4 mg/ml pour 7 millions de cellules et incuber 10 min à 4°C sous agitation régulière
- Stopper la réaction en ajoutant 1 ml de PBS 1X
- Centrifuger 10 min à 10000g à 4°C
- Retirer le surnageant et laver le culot avec 1ml de PBS 1X
- Prendre 15  $\mu$ l d'homogénat cellulaire pour le dosage des protéines en diluant au  $\frac{1}{2}$  dans du NaCl selon la méthode décrite précédemment
- Centrifuger 10 min à 10000g à 4°C
- Retirer le surnageant et reprendre le culot par du tampon phosphosafé + antiprotéase 1X (5,5mg de protéine/ml de tampon) si l'acétylation et la phosphorylation doivent être testées par la suite. Sinon le culot peut être repris dans du PBS seul.
- Réaliser un western-blot avec deux anticorps dirigés contre le complexe I (NDUFA9 et NDUFB8) puis contre le complexe II (utilisé comme marqueur de charge), afin de vérifier que la préparation des mitochondries est similaire entre les patients et les témoins
- Conserver à -80°C le reste de l'échantillon

### ***2- traitement des échantillons pour l'immunocapture du complexe I***

- Décongeler la suspension cellulaire de mitochondries à 5,5mg/ml
- Prélever la quantité nécessaire de protéines mitochondriales (au minimum 200  $\mu$ g) à diluer dans du PBS1X (qsp 180  $\mu$ l)
- Ajouter du laurylmaltoside 15% dilué au  $1/10^{\text{ème}}$  (soit 20  $\mu$ l dans les 180  $\mu$ l)
- Vortexer et incuber 30 min dans la glace
- Centrifuger pendant 20 min à 16000g à 4°C
- Récupérer le surnageant
- Ajouter les anticorps de capture du complexe I (40  $\mu$ g pour  $< 1$ mg de protéines mitochondriales). En pratique, si le kit d'immunocapture contient des anticorps à la concentration de 10 $\mu$ g/ $\mu$ l de matrice dilués au  $1/16^{\text{ème}}$  dans de l'HBS, on ajoutera 64  $\mu$ l de la solution d'immunocapture (soit 40  $\mu$ g d'anticorps, soit 4 $\mu$ l de volume matrice) dans le surnageant.

- Laisser incuber sous agitation la nuit à 4°C
- Centrifuger 1 min à 1000g pour collecter les billes
- Retirer le surnageant
- Laver les billes en ajoutant 100x volume matrice de tampon de lavage (soit 400 µl)
- Agiter 5 min et centrifuger 1 min à 1000g à 4°C
- Enlever le surnageant et laver une fois
- Eluer le complexe I dans 2 x volume matrice (soit 10µl) dans du tampon d'élution + antiprotéase 1X (40µl d'antiprotéase 25X dans 960 µl de tampon)
- Agiter 10min à 4°C puis centrifuger à 1000g pendant 1 min à 4°C
- Récupérer le surnageant dans un tube et renouveler 2 fois l'étape d'élution (volume final : environ 30 µl)
- Sur un second tube à côté, mettre un volume de tampon d'élution identique à celui obtenu après les trois centrifugations
- Ce tube doit être neutralisé avec le tampon de neutralisation (papier pH) 0,5 µl par 0,5 µl
- Ajouter le volume de tampon de neutralisation nécessaire au tube contenant les surnageants
- Ajouter du tampon échantillon 2X dans ce même tube
- L'échantillon est prêt à être utilisé pour tester l'acétylation et la phosphorylation du complexe I en western-blot

# *AUTRES PUBLICATIONS*

### **Hereditary spastic paraplegia-like disorder due to a mitochondrial ATP6 gene point mutation.**

Verny C, Gueguen N, Desquiret V, Chevrollier A, Prundean A, Dubas F, Cassereau J, Ferre M, Amati-Bonneau P, Bonneau D, Reynier P, Procaccio V

*Mitochondrion 2011,11(1):70-5*

Hereditary spastic paraplegia refers to a genetically heterogeneous syndrome. We identified five members of a family suffering from a late-onset spastic paraplegia-like disorder, carrying the homoplasmic m.9176 T>C mutation in the mitochondrial ATP6 gene. The clinical severity of the disease observed in the family was correlated with the biochemical and assembly defects of the ATP synthase. The m.9176 T>C mutation has been previously associated to Leigh syndrome or familial bilateral striatal necrosis. Other factors such as modifying genes may be involved in the phenotypic expression of the disease. The family belongs to the mitochondrial haplogroup J, previously shown to play a role in modulating the phenotype of mitochondrial diseases and be associated with longevity. Moreover other nuclear modifying genes or environmental factors may contribute to the disease phenotype. This finding extends the genetic heterogeneity of the hereditary spastic paraplegia together with the clinical spectrum of mutations of the ATP6 gene.

### **Ethambutol-Induced Optic Neuropathy Linked to OPA1 Mutation and Mitochondrial Toxicity**

Guillet V, Chevrollier A, Cassereau J, Letournel F, Gueguen N, Richard L, Desquiret V, Verny C, Procaccio V, Amati-Bonneau P, Reynier P, Bonneau D.

*Mitochondrion 2010, 10(2):115-124.*

Ethambutol (EMB), widely used in the treatment of tuberculosis, has been reported to cause Leber's hereditary optic neuropathy in patients carrying mitochondrial DNA mutations. We study the effect of EMB on mitochondrial metabolism in fibroblasts from controls and from a man carrying an OPA1 mutation, in whom the drug induced the development of autosomal dominant optic atrophy (ADOA). EMB produced a mitochondrial coupling defect together with a 25% reduction in complex IV activity. EMB induced the formation of vacuoles associated with decreased mitochondrial membrane potential and increased fragmentation of the mitochondrial network. Mitochondrial genetic variations may therefore be predisposing factors in EMB-induced ocular injury.



## Phenotypic Spectrum of MFN2 Mutations in the Spanish Population

Casasnovas C, Banchs I, Cassereau J, Gueguen N, Chevrollier, A, Martinez-Matos JA, Bonneau D, Volpini V.

*J Med Genet* 2010, 47(4):249-56

**INTRODUCTION :** The most common form of axonal Charcot-Marie-Tooth (CMT) disease is type 2A, caused by mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 (MFN2).

**OBJECTIVE:** The objective of our study is to establish the incidence of MFN2 mutations in a cohort of Spanish patients with axonal CMT neuropathy.

**MATERIAL AND METHODS:** Eighty-five families with suspected axonal CMT were studied. All MFN2 exons were studied through direct sequencing. A bioenergetics study in fibroblasts was conducted using a skin biopsy taken from a patient with an Arg468His mutation.

**RESULTS:** Twenty-four patients from 14 different families were identified with nine different MFN2 mutations (Arg94Trp, Arg94Gln, Ile203Met, Asn252Lys, Gln276His, Gly296Arg, Met376Val, Arg364Gln and Arg468His). All mutations were found in the heterozygous state and four of these mutations had not been described previously. MFN2 mutations were responsible for CMT2 in 16% +/- 7% of the families studied and in 30.8 +/- 14.2% (12/39) of families with known dominant inheritance. The bioenergetic studies in fibroblasts show typical results of MFN2 patients with a mitochondrial coupling defect (ATP/O) and an increase of the respiration rate linked to complex II.

**CONCLUSION:** It is concluded that mutations in MFN2 are the most frequent cause of CMT2 in this region. The Arg468His mutation was the most prevalent (6/14 families), and our study confirms that it is pathological, presenting as a neuropathy in a mild to moderate degree. This study also demonstrates the value of MFN2 studies in cases of congenital axonal neuropathy, especially in cases of dominant inheritance, severe clinical symptoms or additional symptoms such as optic atrophy.

## RESUME

La maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) représente un large groupe hétérogène de neuropathies périphériques héréditaires. Les mutations du gène *GDAP1* (ganglioside-induced differentiation-associated protein 1), codant pour une protéine de la membrane externe mitochondriale, sont associées à des formes récessives (CMT4A) et à des formes dominantes de CMT (CMT2K). *GDAP1* participerait au processus de fission des mitochondries sans que son rôle soit bien défini. L'objectif de ce travail a été d'étudier le métabolisme énergétique mitochondrial de cellules de peau issues de patients porteurs de mutations du gène *GDAP1*. Nous avons mis en évidence un déficit énergétique mitochondrial associé au complexe I sans altération majeure du réseau mitochondrial. Ce déficit fonctionnel du complexe I est associé à une production accrue de radicaux libres et un défaut de régulation de la protéine sirtuine 1, une désacétylase NAD-dépendante impliquée dans la biogenèse mitochondriale. Nos travaux ont ainsi montré que *GDAP1* a un rôle important dans le métabolisme énergétique mitochondrial. Dans le but d'établir des corrélations génotype-phénotype, nous avons créé une base de données internationale permettant de répertorier les données cliniques et les variations de séquence de *GDAP1*.

**Mots-clés** : maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 4A/2K, *GDAP1*, dynamique mitochondriale, métabolisme énergétique mitochondrial, base de données.

## ABSTRACT

**Pathophysiology of Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/2K associated with *GDAP1* gene mutations.** Charcot-Marie-Tooth disease represents a large group of heterogeneous disorders leading to inherited peripheral neuropathies. Mutations in *GDAP1* (Ganglioside-induced Differentiation-Associated-Protein 1), encoding a protein anchored to the outer mitochondrial membrane, are associated with recessive forms of CMT (CMT4A) and with autosomal dominant forms (CMT2K). The function of the *GDAP1* protein is not fully understood but it has been suggested to play a role in mitochondrial fission. The aim of this work was to investigate mitochondrial bioenergetics in skin fibroblasts from patients harboring mutations in *GDAP1*. We showed a mitochondrial complex I deficiency with a reduction of ATP production, without major alteration of mitochondrial network. This complex I defect was associated with a reactive oxygen species production and a dysregulation of the NAD-dependent deacetylase sirtuin-1 level, a protein involved in mitochondrial biogenesis. These results demonstrate that *GDAP1* protein plays a major role in mitochondrial energetic metabolism. In order to establish genotype-phenotype correlations, we have created an international locus specific database containing the sequence variants of *GDAP1* associated with patient clinical data.

**Keywords:** Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/2K, *GDAP1*, mitochondrial dynamics, mitochondrial energetic metabolism, database.