



HAL
open science

Développement d'une stratégie thérapeutique anti-répliquative via l'exploitation de la voie d'import des ARN dans les mitochondries humaines

Yann Tonin

► **To cite this version:**

Yann Tonin. Développement d'une stratégie thérapeutique anti-répliquative via l'exploitation de la voie d'import des ARN dans les mitochondries humaines. *Génomique, Transcriptomique et Protéomique [q-bio.GN]*. Université de Strasbourg, 2013. Français. NNT : 2013STRAJ093 . tel-01144396

HAL Id: tel-01144396

<https://theses.hal.science/tel-01144396>

Submitted on 21 Apr 2015

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.

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Sciences du Vivant

Domaine : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

Yann TONIN

**Développement d'une stratégie thérapeutique anti-répllicative via
l'exploitation de la voie d'import des ARN dans les
mitochondries humaines**

Soutenue le 27 septembre 2013 devant la commission d'examen composée par :

Dr Agnès RÖTIG

Rapporteur externe

Dr Rémy BORDONNE

Rapporteur externe

Pr Catherine FLORENTZ

Examinatrice interne

Dr Nina ENTELIS

Directrice de thèse

UMR 7156 CNRS-UdS

« Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie »

Université de Strasbourg

2013

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Sciences du Vivant

Domaine : Aspects Moléculaires et Cellulaires de la Biologie

Par

Yann TONIN

**Développement d'une stratégie thérapeutique anti-répllicative via
l'exploitation de la voie d'import des ARN dans les
mitochondries humaines**

Soutenue le 27 septembre 2013 devant la commission d'examen composée par :

Dr Agnès RÖTIG

Rapporteur externe

Dr Rémy BORDONNE

Rapporteur externe

Pr Catherine FLORENTZ

Examinatrice interne

Dr Nina ENTELIS

Directrice de thèse

UMR 7156 CNRS-UdS

« Génétique Moléculaire, Génomique et Microbiologie »

Au risque de m'étendre quelque peu sur les prochaines pages, je souhaite débiter ce manuscrit en remerciant tous ceux qui y ont participé de près ou de loin.

Avant tout, je remercie la Fondation pour la Recherche Médicale et l'Association Française contre les Myopathies pour leur aide financière dans la conduite de ces travaux.

En premier lieu, je tiens d'abord à remercier les membres de mon jury qui par leur gentillesse, me font l'honneur d'évaluer mon travail de thèse, à savoir les docteurs Agnès Rötig et Rémy Bordonné ainsi que le professeur Catherine Florentz. J'espère que vous trouverez à la lecture de ce manuscrit autant de plaisir que j'en ai eu à le rédiger.

Associé à eux, je tiens à remercier le Dr Robert Martin qui me fait non seulement l'honneur, mais également le plaisir d'avoir accepté de faire partie de ce jury en tant que membre invité. Je vous remercie Robert, de m'avoir accueilli au sein de cette merveilleuse unité qui m'a assuré une atmosphère de travail des plus propice à mon épanouissement scientifique et personnel, et où j'ai pu rencontrer des gens formidables.

Je tiens ensuite à remercier le Dr Ivan Tarassov, alias « Vania » de m'avoir accueilli au sein de la fameuse « Equipe Mito ». Plus que le fait de m'avoir offert un sujet de thèse, vous m'avez donné ma chance et pour cela je vous en suis infiniment reconnaissant. Ce fut une fierté pour moi. Je tiens également à vous remercier pour votre gentillesse tout au long de ces quatre années. Des conseils scientifiques aux anecdotes, en passant par les barbecues dans votre agréable jardin, sachez que j'ai apprécié chacun de ces moments.

A présent, je souhaite remercier celle qui m'a expliqué, conseillé, aidé, guidé et parfois même rassuré durant ces quatre années, ma directrice de thèse, le Dr Nina Entelis. Je vous remercie Nina de votre attention quotidienne et de votre patience. Et Dieu sait qu'il en faut parfois avec moi. Vous avez su m'enseigner l'art d'étudier les mitochondries mais pas seulement. Vous m'avez beaucoup apporté et grâce à vous, je pense avoir évolué et appris. J'espère également vous avoir rendu fière par mon travail, comme j'ai pu être fier de vous avoir comme mentor. Je souhaite à tous doctorant s'engageant dans cette dure voie qu'est la thèse, d'avoir une directrice de thèse telle que vous.

S'il y en est une qui doit être également remerciée en bonne et due forme, c'est mon acolyte de bureau, Anne-Marie dite « M'ame Heckel » pour les intimes. Je ne sais par où commencer pour te remercier ma bonne Âme-Marie. Ta gentillesse et ton aide précieuse ont rendu ce séjour des plus agréables et des plus sûrs. Ben oui, une ACMO, pardon AP, à coté de soi, ça tranquillise. J'ai beau réfléchir, je ne me souviens pas d'un jour ou je n'ai pas ri en ta présence, et ce même pendant ma rédaction, c'est dire ! Retrouver une collègue telle que toi ne sera pas chose facile, mais impossible car il n'y a pas à dire, c'est vraiment toi la chef M'ame Heckel ;-).

Aaaah ! L' « Equipe Mito » ! C'est vraiment une grande famille. Alors même si les prochains sont déjà docteurs, je vais abandonner quelques instants les formalités d'usage.

Je tiens d'abord à remercier les aînés : Olga et Mike ! Vous avez été en quelques sortes mes modèles lorsque j'usais les fonds de culotte de mes premières blouses en salle de réunion (je rassure les ACMO, c'est seulement une image, je sais que l'on n'a pas le droit d'avoir sa blouse en salle de réunion). Olga, j'aurais seulement souhaité que ton séjour soit un peu plus long, mais j'ai été très heureux de partager ces quelques mois avec toi.

Mike, I don't have enough (english) words to thank you. You taught me so much about the secrets of mitochondria, respiration, microscopy and naked mole rat. Your kindness is matched only by your infinite wisdom.

S'il y en est un que je ne peux que m'empresse de remercier également, c'est toi Sacha ! Merci pour ta gentillesse et l'accueil envers le petit nouveau que j'étais. Les discussions à la cantine à propos des smoothies et autres recettes ont rendu ces déjeuners plus que parfaits. Je tiens ensuite à remercier l'une de mes grandes sœurs en quelques sortes. Merci beaucoup Olga. C'est à toi que je dois l'art de savoir dompter les cellules. Tu as su m'apprendre avec brio (et dans un anglais et un français parfaits) l'art et la manière d'appriivoiser celles que je redoutais tant. Je penserai toujours à toi dès que je verrai une de ces petites boîtes roses.

Que serait une famille, sans le (très) grand frère ?! Tom, mon inséparable complice de congrès. Je pense que nous en aurons vu du pays ensemble et je n'aurais pas pu rêver meilleur compagnon de route. De la découverte des spécialités culinaires ukrainiennes aux paysages crétois, en passant par la non moins exotique Colle-sur-Loup, je garderai en mémoire (et en fous-rires) chacun de ces fabuleux séjours.

Dans la famille Mito, je demande à présent les cadets.

Même si je suis convaincu que tu comprendrais ces quelques lignes en français, I'll use the language of Shakespeare to thank you Ali. At the same, I congratulate you for your (future) new promotion as PhD and wish you all the best.

Since I'm in english mode, I'll will take this opportunity Ilya. I want to thank you a lot for your kindness, your recipes and your amazing stories. I wish you a lot of success in your experiments and in your life. I'll never forget you. No ! No ! No !

Enfin, passons aux benjamins, dont la route qui les mène à leur manuscrit nécessitera encore un peu de temps et beaucoup de sueur.

J'aurais pu continuer quelques temps en anglais pour te remercier, mais je suis sûr que tu préfères ainsi pour améliorer ton français déjà si bon. Merci à toi Ivan. Je serai toujours impressionné par la manière dont tu manies la hache pour préparer des grammes, que dis-je des kilogrammes de mitochondries. Bonne chance à toi et bonne continuation.

Enfin je souhaite bonne chance à Romuald dans la perpétuation de ces travaux. J'espère que ce manuscrit saura t'aider, comme ceux de mes prédécesseurs m'ont aidés.

Enfin même si tous deux sont déjà docteurs (ou en passe de le devenir), je tiens à cristalliser mes remerciements sous cette forme aux nouveau-nés de l'équipe, à savoir Benoît et Mélanie. Merci à toi Benoît pour tes conseils et remarques avisés. Quant à toi ma compagne de galère, ce fut un plaisir de ramer en ta compagnie. Les pauses de 16h plus que nécessaires nous auront évité la folie (totale). Enfin j'espère :-/.

Большое спасибо! Pour ceux qui ne parleraient pas russe et qui se seraient perdus en chemin, je tiens par ces mots à remercier nos collaborateurs moscovites, Piotr et Katya. Tes visites annuelles Piotr, m'ont toujours permis de me remettre du nouvel an et de me rendre compte que nous avons abordé une nouvelle année.

Katya, je te remercie de ta gentillesse et de ton enseignement du russe, même si mon talent dans l'apprentissage de cette langue n'atteindra jamais le tien dans le maniement du français.

Si l'on devait rester dans l'idée de la famille, on pourrait dire que les suivants sont les cousins de l'étage.

Merci à toi Sylvie, à ta bonne humeur quotidienne et ton optimisme inégalable. Par contre je ne te remercierai pas pour tes attentats au munster, même présent par 35°C. Merci à toi Bruno, notre cher « happy-culteur », et à ta boîte à outils, qui m'a souvent servie pour me sortir d'un mauvais pas avec une centrifugeuse ou une agrafeuse (aucun lien entre les 2). Merci à toi Johan de tes visites de bon voisinage, pour tes excellents conseils et tes mauvaises blagues. Tu as été durant toutes ces années un très très bon voisin, Bernie ;-).

Merci Dimitri pour les soirées quiz, tes excellentes playlists qui résonnaient jusqu'à mon labo et tes « blagues du jour ». Merci Joëlle pour ta gentillesse et d'avoir endossé le rôle annuel de Mère Noël. Merci aux flegmatiques Serge et Matthias et à leur Bouneschlupp, à la pétillante Fanny, à Vincent le globe-trotter ainsi qu'à Barbara pour qui j'ai une pensée émue. Merci aux Alines. Tout d'abord à toi Aline (K pour les puristes) de m'avoir épargné nombre de méandres administratifs. Cette thèse, c'est aussi un peu grâce à toi et à ton bon de commande qu'elle a pu voir le jour. Ensuite merci à toi Aline (H), qui depuis l'autre côté du couloir a veillé sur ma santé, même si ton fichier FEVAR semble plutôt lui nuire.

J'en profite pour rester dans cette aile du bâtiment et remercier Hubert et « sa team » : Bruno, Ludo, Daphné, Jonathan, Yuhei et Gaetan. Sachez conserver cette ambiance qui fait la richesse de notre unité. Et Ludo, c'est toi le prochain ;-) !

Je remercie ceux qui œuvrent au labo pour nous offrir de bonnes conditions de travail : Christiane, Dilek, Elena et Didier. Merci à ce dernier d'avoir sauvé à plusieurs reprises mon ordinateur pour que je puisse mener cette rédaction à bien.

Merci également à la « délégation qPCR » du département 1. Cyrielle, Sandrine, Jing et Paul, vos venues agrémentées de nos petites pauses discussions furent toujours un réel plaisir.

Ces quatre années ont également été pour moi l'occasion de transmettre à mon tour ce que j'avais appris. Je remercie Vania de m'avoir fait confiance pour assurer cette tâche et je remercie mes stagiaires Catherine, Virginie et Laure. Même si c'est à vous que j'espère avoir appris des choses, chacune à votre manière vous m'avez permis d'en découvrir un peu plus sur moi et de m'améliorer en tant que maître de stage. Je vous souhaite à chacune une bonne continuation et beaucoup de réussite pour vos projets futurs.

Je remercie ceux qui ont collaborés à l'élaboration de ce travail à savoir le Dr Alya Venyaminova pour la synthèse des oligonucléotides modifiés, le Dr Ian Holt et son équipe pour le protocole de LM-PCR et les conseils pour les gels 2D, et le Dr Jérôme Mutterer et son aide précieuse pour mes débuts aux manettes d'un microscope confocal.

Je veux remercier ceux qui m'ont permis de mettre la main à la pipette : Gilbert et Franck. Vos conseils durant mon master m'auront beaucoup servis et me serviront encore. Merci à toi Franck pour ton initiation à Illustrator. Sache que je l'ai bien mise à profit pour mes posters, schémas et la création du fameux logo MitoCross qui me survivra au sein du labo.

Je tiens à présent à remercier mes ami(e)s. Tout d'abord mes copines du mercredi (mais pas seulement). Merci à toi Laure ! à toi Mélanie ! et à toi Lydia ! Ce fut chaque semaine un enchantement de partager un peu de temps avec vous, pour se changer les idées entre 2 manips et bien rigoler. Merci pour votre infinie gentillesse et à bientôt pour l'apéro.

Gratias tibi ago Fred ! Je ne sais pas comment j'aurais affronté les affres du master et de la thèse sans toi cher comparse. Et tu as de la chance que je sois (bientôt) docteur sinon... ;-)
Pêle-mêle, merci à mes autres collègues de promo : Cédric, Anne, Sophie, Vincent, Céline et Thibaud. Rendez-vous à la prochaine thèse et j'espère aussi pour d'autres évènements !

Car la vie au labo est une chose mais que la vie en général en est une autre, je remercie ma famille qui a toujours été là pour moi et plus particulièrement ma maman qui m'a toujours soutenu et encouragé. Je pense qu'avec toutes mes histoires de mito... comment ? ...chondries ? Oui, avec un h !, tu dois en savoir presque autant que moi à présent. :-D Je te remercie beaucoup, beaucoup, beaucoup, beaucoup, beaucoup et BEAUCOUP maman !

Enfin, la dernière mais non des moindres, celle qui a partagé mon bureau avant de partager ma vie, Caroline. Je n'aurai jamais assez de mots pour te remercier d'avoir été présente et su m'épauler en science comme dans la vie. Merci, merci, merci infiniment ma chérie. :-)

Car j'ai déjà noirci bien des pages et que je ne voudrais pas user mes humbles lecteurs, je vais m'arrêter là et remercier de manière globale ceux que j'aurais pu oublier.

A présent, il ne me reste plus qu'à vous souhaiter une bonne lecture !

TABLE DES MATIERES

Partie I : INTRODUCTION

I. La mitochondrie	1
1. Un peu d'histoire	1
2. Origine	5
3. Structure.....	6
4. Fonctions	9
4.1 Voies métaboliques	9
4.2 Phosphorylation oxydative	11
5. Génétique mitochondriale	13
5.1 L'ADNmt mitochondrial humain	14
5.2 Le nucléoïde	15
6. Le dogme génétique chez la mitochondrie	18
6.1 Réplication	18
6.1.1 Le réplisome.....	18
6.1.2 Modèles de réplication	19
6.2 Réparation	23
6.3 Transcription.....	26
6.4 Traduction	28
II. Maladies mitochondriales	30
1. Maladies associées à une mutation dans l'ADN mitochondrial	31
1.1 Caractéristiques mitochondriales	31
1.2 Mutations ponctuelles.....	34
1.3 Délétions et réarrangements de l'ADN mitochondrial	36
2. Maladies associées à une mutation dans l'ADN nucléaire	38
2.1 Mutations des gènes structuraux de la chaîne respiratoire	38
2.2 Mutations des gènes des facteurs d'assemblage	39
2.3 Mutations des gènes des facteurs contrôlant la maintenance de l'ADNmt	39
3. Modèles d'études des maladies mitochondriales	41
3.1 Cellules cybrides	41
3.2 Le modèle levure	42
3.3 Le modèle murin.....	43
4. Stratégies thérapeutiques.....	44
4.1 Prévention de la transmission des maladies génétiques.....	45
4.2 Diminution du taux d'hétéroplasmie.....	46
4.2.1 Utilisation d'enzymes de restriction	46
4.2.2 Utilisation de nucléases à doigt de zinc	47
4.2.3 Stratégie anti-répllicative.....	48
4.2.4 Enrichissement en ADNmt sauvage	50
4.3 Remplacement des gènes mitochondriaux défectueux	51
4.3.1 Transduction de protéines et transfert de gènes	51
4.3.2 Import d'ARNt.....	52
4.3.3 Expression allotopique de protéines	53
4.4 Elimination des intermédiaires toxiques	54
III. Import mitochondrial	55
1. Import des protéines	55
2. Import des ARN	57

📄 Article n°1	61
Mitochondrial targeting of RNA and mitochondrial translation	
Partie II : RESULTATS & DISCUSSION	
I. Mise en évidence des arrêts de la réplication	64
1. Modélisation de la stratégie anti-génomique vis-à-vis d'une large délétion associée au syndrome Kearns-Sayre.....	64
1.1 Modèle d'étude	64
1.2 Développement et caractérisation des ARN recombinants FD-H et FD-L	65
1.3 Effet des ARN anti-KSS sur le niveau d'hétéroplasmie	67
2. Etude de l'action des ARN anti-KSS sur le mécanisme de réplication <i>in vivo</i>	69
2.1 Principe d'analyse de la réplication d'ADN par électrophorèse bidimensionnelle	69
2.2 Action anti-répllicative des ARN anti-KSS <i>in vivo</i>	72
📄 Article n°2	77
Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome	
II. Optimisation de la stratégie anti-génomique	79
1. Création des ARN anti-génomiques modifiés	80
2. Evaluation de la spécificité des ARN modifiés	82
3. Evaluation de la stabilité des ARN modifiés <i>in vivo</i>	83
4. Evaluation de l'effet sur l'hétéroplasmie des ARN modifiés.....	83
📄 Article n°3	85
Characterization of chemically modified oligonucleotides targeting a pathogenic mutation in human mitochondrial DNA	
III. Développement de la stratégie anti-génomique vis-à-vis de mutations ponctuelles	87
1. Développement d'une stratégie anti-génomique ciblant une mutation ponctuelle dans le gène de l'ARNt^{Leu}	87
1.1 Modèle d'étude	87
1.2 Modélisation <i>in silico</i> des ARN anti-génomiques	88
1.3 Etude de la spécificité des ARN vis-à-vis de la mutation ponctuelle A3243G	90
1.4 Etude de la capacité d'import mitochondrial	94
1.5 Etude de l'effet des ARN recombinant anti-ARNt ^{Leu} sur le taux d'hétéroplasmie.....	96
1.6 Extinction de l'expression du facteur de terminaison mTERF par ARN interférence	98
2. Développement d'une stratégie anti-génomique ciblant une mutation ponctuelle dans le gène de la sous-unité COX I	101
2.1 Structure et spécificité des ARN recombinants dirigés contre la mutation A7339G.....	101
2.2 Stabilité et import des ARN recombinants dirigés contre la mutation A7339G.....	102
2.3 Etude de l'effet des ARN recombinants anti-COX I sur le taux d'hétéroplasmie.....	103
3. Développement d'une stratégie anti-génomique ciblant une mutation ponctuelle dans le gène de la sous-unité ND5	105
3.1 Structure et spécificité des ARN recombinants dirigés contre la mutation A13514G.....	106
3.2 Stabilité et import des ARN recombinants dirigés contre la mutation A13514G.....	106
3.3 Etude de l'effet des ARN recombinants anti-ND5 sur le taux d'hétéroplasmie	108
📄 Article n°4	111
Modelling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by imported RNA targeting a pathogenic point mutation in mtDNA	

IV. Etude des aspects phénotypiques associés à une diminution de l'hétéroplasmie	113
1. Mesure du niveau de respiration cellulaire	113
2. Mesure de l'activité des complexes respiratoires	115
3. Organisation du réseau mitochondrial et niveau d'énergisation des mitochondries	116
4. Détermination des sites d'arrêt de la réplication par LM-PCR	119

Partie III : CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

I. Comment démontrer in vivo l'impact des ARN anti-réplicatif sur la réplication de l'ADNmt mutant ?	123
II. Peut-on optimiser l'effet des ARN anti-réplicatif par l'ajout de modifications chimiques ?	125
III. Est-il possible d'étendre la stratégie anti-réplivative à des mutations ponctuelles ?	126

Partie IV : MATERIEL & METHODES

I. Matériel	131
1. Lignées cellulaires	131
2. Milieux de culture	132
3. Outils informatiques	133
II. Méthodes	135
1. Culture cellulaire	135
1.1 Culture des cellules	135
1.1.1 Décongélation	135
1.1.2 Culture	135
1.1.3 Détachement	135
1.1.4 Congélation et stockage des cellules	136
1.1.5 Comptage des cellules	136
1.1.6 Détection de contamination par des mycoplasmes	136
1.2 Transfection	137
2. Techniques relatives à l'étude des acides nucléiques	137
2.1 Extraction d'ADN total	137
2.2 Extraction d'ARN total	138
2.3 Isolement d'ARN mitochondrial	138
2.4 Amplification d'ADN	139
2.4.1 Amplification des matrices pour la transcription T7 par PCR	139
2.4.2 Amplification par PCR quantitative en temps réel : mesure du taux d'hétéroplasmie des cellules porteuses de la délétion	140
2.4.3 Amplification par PCR et analyse des fragments de restriction : mesure du taux d'hétéroplasmie pour les mutations ponctuelles	142
2.5 Synthèse d'ARN	143
2.5.1 T7 transcription	143
2.5.2 T7 transcription d'ARN marqué avec un fluorophore	143
2.5.3 Marquage radioactif d'ARN au ³² P	144
2.6 Séparation des acides nucléiques	145
2.6.1 Electrophorèse sur gel d'agarose	145
2.6.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives	146
2.6.3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes	146
2.7 Southern Blot	147
2.8 Northern blot	148
2.9 Analyse des intermédiaires de la réplication par électrophorèse bidimensionnelle	149
2.9.1 Isolation et purification d'ADNmt à partir de cellules en culture	149

2.9.2 Digestion d'ADNmt par les enzymes de restriction	151
2.9.3 Electrophorèse bidimensionnelle	151
2.9.4 Transfert de type Southern et hybridation	152
2.10 Visualisation des arrêts dans la réplication par LM-PCR	153
2.10.1 Synthèse du premier brin	153
2.10.2 Création du linker universel et ligation.....	154
2.10.3 Amplification classique par PCR.....	155
2.10.4 Marquage des oligonucléotides internes	156
2.10.5 Primer extension.....	157
2.11 Analyse de l'import des ARN recombinants par microscopie confocale	158
3. Techniques relatives à l'étude des protéines	158
3.1 Dosage protéique par la Méthode de Bradford	158
3.2 Western blot.....	158
3.3 Détermination de l'interaction ADN/protéine par expérience de retard sur gel	160
3.4 Test de traduction	161
3.5 Mesure de l'activité du complexe I.....	162
3.6 Mesure de la consommation d'oxygène	163

Partie V : BIBLIOGRAPHIE

Références bibliographiques	165
-----------------------------------	-----

Partie VI : RESUME DE LA THESE

Contexte scientifique	181
Objectifs.....	182
Résultats	183
Conclusions – perspectives.....	184
Publications & communications	185
Publications	185
Communications.....	185
Prix et distinctions.....	186

TABLE DES ILLUSTRATIONS

FIGURES

Figure 1 : Images de mitochondries de rein observées par microscopie électronique	2
Figure 2 : Quelques grandes figures des mitochondries.....	3
Figure 3 : Taux de publication dans PubMed d'articles portant sur les mitochondries de 1913 à nos jours	4
Figure 4 : Frise chronologique des découvertes majeures sur les mitochondries	4
Figure 5 : La théorie endosymbiotique	6
Figure 6 : Structure générale de la mitochondrie	7
Figure 7 : Organisation dynamique des mitochondries	8
Figure 8 : Organisation de la chaîne respiratoire	9
Figure 9 : Glycolyse, β -oxydation et cycle de Krebs	11
Figure 10 : Organisation de l'ADN mitochondrial humain	14
Figure 11 : Organisation structurale du nucléoïde.....	16
Figure 12 : Réplisome et réplication de l'ADNmt.....	19
Figure 13 : Modèle de réplication asynchrone.....	21
Figure 14 : Modèle de réplication synchrone et RITOLS	22
Figure 15 : Dommages mitochondriaux et maintenance de l'ADNmt	25

Figure 16 : Représentation schématique de la région promotrice non codante de l'ADNmt.....	26
Figure 17 : Code génétique mitochondrial et position wobble modifiée	29
Figure 18 : Tableau clinique des maladies mitochondriales	30
Figure 19 : Principe de l'hétéroplasmie	33
Figure 20 : Mutation de l'ARNt ^{Leu} et syndromes associés.....	35
Figure 21 : Mécanismes de formation d'une délétion	37
Figure 22 : Gènes mitochondriaux et nucléaires affectés par une mutation.....	40
Figure 23 : Création de cellules cybrides.....	42
Figure 24 : Organisation et structure des nucléases à doigt de zinc (ZFN)	47
Figure 25 : Stratégie anti-réplicative et structure des PNA.....	49
Figure 26 : Le protéome mitochondrial	55
Figure 27 : La voie générale d'import des protéines.....	56
Figure 28 : Les voies d'import des ARN.....	60
Figure 29 : Carte de l'ADNmt humain sauvage et délété.....	65
Figure 30 : Structure des ARN ayant servis à la construction des ARN anti-génomiques.....	66
Figure 31 : Principe de mesure du taux d'hétéroplasmie par qPCR.....	67
Figure 32 : Effet des ARN recombinants sur le taux d'hétéroplasmie	68
Figure 33 : Schéma explicatif du principe de l'électrophorèse bidimensionnelle.....	70
Figure 34 : Profil de migration des intermédiaires de réplication	71
Figure 35 : Cartographie des fragments d'ADNmt après digestion par <i>BlnI</i>	74
Figure 36 : Effet des ARN recombinants sur la réplication de l'ADNmt mutant in vivo.....	75
Figure 37 : Structures des ARN recombinants modifiés.....	81
Figure 38 : Spécificité d'hybridation des ARN recombinants modifiés	82
Figure 39 : Modélisation <i>in silico</i> des ARN anti-génomiques	89
Figure 40 : Structure des ARN recombinants dirigés contre la mutation A3243G du gène de l'ARNt ^{Leu}	91
Figure 41 : Spécificité des ARN recombinants ciblant la mutation A3243G dans le gène de l'ARNt ^{Leu}	92
Figure 42 : Structures secondaires alternatives des ARN dirigés contre la mutation A3243G	93
Figure 43 : Evaluation de l'efficacité d'import des ARN recombinants dans les mitochondries.....	95
Figure 44 : Principe de mesure du taux d'hétéroplasmie par analyse des fragments de restriction pour la mutation A3243G	97
Figure 45 : Effet des ARN recombinants dirigés contre la mutation ponctuelle A3243G sur l'hétéroplasmie	98
Figure 46 : Mesure du taux de protéine mTERF par expérience de retard sur gel	99
Figure 47 : Effet sur l'hétéroplasmie des ARN recombinants après ARN interférence.....	100
Figure 48 : Structure et spécificité des ARN recombinants dirigés contre la mutation A7339G	102
Figure 49 : Stabilité et import des ARN recombinants dirigés contre la mutation A7339G.....	103
Figure 50 : Principe de mesure du taux d'hétéroplasmie par analyse des fragments de restriction pour la mutation A7339G	104
Figure 51 : Effet des ARN recombinants dirigés contre la mutation ponctuelle A7339G sur l'hétéroplasmie ...	105
Figure 52 : Structures des ARN recombinants dirigés contre la mutation A13514G	106
Figure 53 : Suivi de l'import de l'ARN FD20H ^{ND5} dans des cellules humaines par microscopie confocale.....	107
Figure 54 : Principe de mesure du taux d'hétéroplasmie par analyse des fragments de restriction pour la mutation A13514G	108
Figure 55 : Effet des ARN recombinants dirigés contre la mutation ponctuelle A7339G sur l'hétéroplasmie ...	109
Figure 56 : Mesure de la consommation d'oxygène des cellules ND5.....	114
Figure 57 : Mesure de l'activité du complexe I	115
Figure 58 : Organisation du réseau mitochondrial et microscopie confocale	117
Figure 59 : Principe de la LM-PCR	120

TABLEAUX

Tableau 1 : Mutations dans l'ADNmt et pathologies associées	32
Tableau 2 : Sous-unités et facteurs d'assemblage de la chaîne respiratoire	39
Tableau 3 : Import d'ARN dans le règne vivant ARN.....	58
Tableau 4 : Primers et conditions de PCR pour la détection de mycoplasmes.....	137
Tableau 5 : Primers et conditions de PCR pour l'amplification des matrices.....	139
Tableau 6 : Séquences des matrices servant à la synthèse des ARN et couples d'amorces utilisés pour leur synthèse.....	140

Tableau 7 : Primers et conditions de PCR pour la mesure du taux d'hétéroplasmie de la délétion par PCR quantitative	141
Tableau 8 : Primers, conditions de PCR et de digestion pour la mesure du taux d'hétéroplasmie des mutations ponctuelles	142
Tableau 9 : Séquence et température d'hybridation des sondes utilisées pour le Northern Blot.....	149
Tableau 10 : Coordonnées nucléotidiques des sites de coupure et tailles des fragments générés pour l'ADNmt sauvage et muté	151
Tableau 11 : Caractéristiques des amorces servant à l'amplification de la sonde utilisée pour l'électrophorèse bidimensionnelle	153
Tableau 12 : Caractéristiques des primers servant à la création du linker universel.....	155
Tableau 13 : Caractéristiques des primers utilisés pour la LM-PCR	156
Tableau 14 : Caractéristiques des amorces servant à l'amplification du fragment d'ADN utilisé lors de l'expérience de retard sur gel.....	161
Tableau 15 : Tableau récapitulatif des composés utilisés pour la mesure de la consommation d'oxygène	164

AAV : Adeno Associated Virus
ADNmt : ADN mitochondrial
ADNn : ADN nucléaire
ADP : Adénosine diphosphate
ANT : Adenine Nucleotide Translocase
APS : Ammonium Persulfate
ARN : Acide RiboNucléique
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ARNr : Acide RiboNucléique ribosomique
ARNt : Acide RiboNucléique de transfert
ATP : Adénosine triphosphate
BER : Base Excision Repair
Bet : Bromure d'éthidium
BrdU : bromodeoxyuridine
BSA : Bovin Serum Albumin
CACT : Carnitine AcylCarnitine Translocase
CMCO : Cell Membrane Crossing Oligomers
CoA : Coenzyme A
CoQ : Coenzyme Q
COX : Cytochrome oxydase (ex. COXI : sous-unité 1 de la Cytochrome oxydase)
CPEO : Chronic Progressive External Ophthalmoplegia
CSB : Conserved Sequence Block
cpm : coup par minute
Cyt b : cytochrome b
Cyt c : cytochrome c
Da : Dalton
DMEM : Dubelcco's Modified Eagle Medium
DMSO : Dimethylsulfoxide
DNase : désoxyribonucléase
dNTP : déoxyribonucléotide-5'-triphosphate
DSBR : Double Strand Break Repair
DTT : Dithiothréitol
EDTA : Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
fccp : Trifluorocarbonylcyanide Phenylhydrazone
FADH₂ : 1,5 dihydro-flavin adenine dinucleotide
HEPES : 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HSP : Heavy Strand Promotor
kDA : kilodalton
KSS : Kearns Sayre Syndrome
LARS : leucyl-ARNt synthétase
LHON : Leber's Hereditary Optic Neuropathy
LM-PCR : Ligation Mediated PCR
LSP : Light Strand Promotor
MELAS : Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes
MERFF : Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers
MINOS : Mitochondrial INner membrane Organizing System
MMR : MisMatch Repair
MRP : Mitochondrial RNA Processing
MTD : Mitochondrial Transduction Domain
mTERF : Mitochondrial Transcription Termination Factor
MTRPOL : Mitochondrial RNA Polymerase
MTS : Mitochondrial Targeting Sequence

ND : NADH déhydrogenase (ex. ND5 : sous-unité 5 de la NADH déhydrogenase)
mt : mitochondrial
NAD : Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADH : Nicotinamide Adenine Dinucleotide reduced form
NARP : Neuropathy Ataxia and Retinis Pigmentosa
NCR : Non Coding Region
nt : nucléotides
O_H : Origine de réplication du brin H
O_L : Origine de réplication du brin L
pb : paire de bases
PCR : Polymerase Chain Reaction
PBS : Phosphate Buffer Saline
pH : potentiel hydrogène
POL : polymérase
PNA : Peptide Nucleic Acid
qPCR : PCR quantitative
qsp : quantité suffisante pour
RIC : RNA Import Complex
RITOLS : Ribonucleotide Incorporation ThroughOut the Lagging Strand
RNase : Ribonucléase
ROS : Reactive Oxygen Species
SDS : Sodium Dodecyl Sulfate
SMY : Slow migratingY-like arc
SSBR : Single Strand Break Repair
SSC : Standard Sodium Citrate
SSB : Single Strand DNA Binding Protein
TAE : Tris Acétate EDTA
TAS : Termination-associated Sequence
TBE : Tris Borate EDTA
TE : Tris-EDTA
TEMED : TetraMethylEthyleneDiamine
TFAM : Mitochondrial Transcription Factor A
TFB2M : Mitochondrial Transcription Factor B2
TIM : Translocase of Inner Membrane
TK : Thymidine Kinase
TMRM : TetramethylRhodamine, methyl ester
TOM : Translocase of Outer Membrane
Tris : Tris (hydroxyméthyl)aminométhane
TRK1 : ARNt Lysine 1
TRK2 : ARNt Lysine 2
TRK3 : ARNt Lysine 3
UV : Ultraviolet
VDAC : Voltage Dependant Anion Channel
WT : Wild-type
ZFN : Zinc Finger Nuclease

INTRODUCTION

« Il n'y a de long ouvrage que celui qu'on n'ose pas commencer. Il devient cauchemar »

Charles Baudelaire

I. La mitochondrie

1. Un peu d'histoire

« Les microorganismes et granules sont à un niveau équivalent et représentent des organismes élémentaires que l'on trouve partout où les forces vives agissent, ainsi, nous voulons les décrire par le terme commun de bioblastes. C'est dans le bioblaste, cette unité morphologique de matière, que semble se trouver le vivant »

Richard Altmann (1894)

Même si les premiers écrits faisant état de l'existence des mitochondries remontent aux années 1840, ce n'est véritablement qu'en 1890 que l'existence de ces « organismes élémentaires » fut avancée. C'est à cette date que le cytologiste allemand Richard Altmann fit la description de petits bâtonnets résultant de l'agglomération de grains colorés doués de fonctions vitales qu'il nomma bioblastes ([Ernster and Schatz, 1981](#)). Il décrivit ces granules comme des bactéries vivant en colonie et postula de leur autonomie à la fois génétique et métabolique. Tombées dans l'oubli, il fallut attendre 1898 et les travaux de Carl Benda pour que l'intérêt suscité par ces étranges particules revienne sur le devant de la scène et qu'elles acquièrent leur nom actuel : les mitochondries (du grec $\mu\iota\tau\omicron\varsigma$ [mitos]: filament et $\gamma\omicron\nu\delta\rho\omicron\varsigma$ [chondros] : granule). C'est à cette même période que la fonction première des mitochondries, à savoir la respiration, fut envisagée avec l'observation de leur potentiel oxydo-réducteur par Leonor Michaelis. Mais la preuve ne sera apportée que 40 ans plus tard suite à l'isolement de mitochondries. On mit également au jour la présence de protéines, de lipides et des indispensables cytochromes au sein des mitochondries, ainsi que la présence de ces organites chez les plantes. Au cours des années 40, avec l'amélioration des techniques de purification, les démonstrations sur les fonctions biochimiques des mitochondries se multiplièrent avec la compréhension de la formation de molécules d'ATP à partir d'oxygène, la découverte de la succinate déhydrogénase, de la cytochrome oxydase et la caractérisation des enzymes impliquées dans le cycle de l'acide citrique. En 1945 les premières observations microscopiques furent effectuées mais elles ne permirent de dresser que les grandes lignes de la structure des mitochondries et ce n'est qu'en 1952 que le premier portrait détaillé fut présenté à la communauté scientifique. C'est Georg Emil Palade, à qui l'on devra quelques années plus tard la mise en lumière du

ribosome, qui effectua ce premier cliché en haute résolution (**Figure 1**), révélant ainsi l'existence d'une double membrane dessinant au sein de la mitochondrie de multiples repliements qu'il nomma *cristae* mitochondriales.

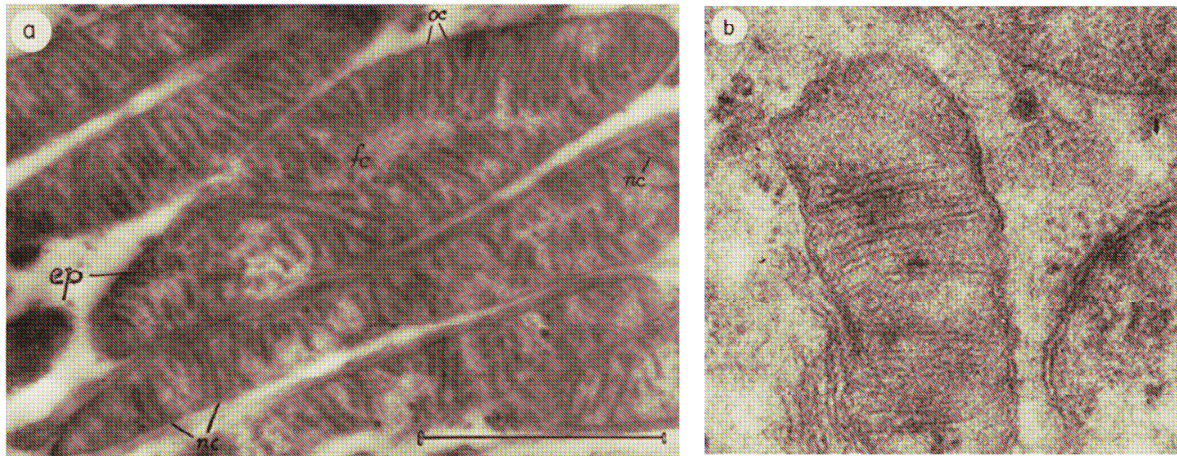


Figure 1 : Images de mitochondries de rein observées par microscopie électronique

Ces clichés représentent les premières images de mitochondries obtenues par microscopie électronique en 1953 par Palade (**a**) (grossissement x 45 700) et Sjöstrand (**b**) (grossissement x 120 000). (Ernster and Schatz, 1981)

Avec la découverte de cette membrane, c'est aussi la localisation de la chaîne respiratoire qui fut avancée et amena avec elle l'idée de « centrale énergétique de la cellule ». C'est à elle et à l'étude de son mécanisme que furent essentiellement dédiées les recherches menées dans les années 60 avec la caractérisation des membranes externe et interne ou celle de l'ATP synthase. Mais cette décennie est surtout marquée par l'hypothèse chimio-osmotique et l'énonciation du principe de phosphorylation oxydative par Peter Mitchell, qui lui vaudra le prix Nobel en 1978. L'une des autres découvertes majeures fut celle d'un ADN propre à la mitochondrie, renforçant l'idée qu'Altmann avait avancée lors de sa découverte, à savoir l'autonomie génétique de ces particules élémentaires. Mais ce n'est qu'aux environs de 1970 avec l'arrivée des méthodes de cartographie des gènes que les cartes génétiques comme celle de l'ADNmt de levure furent dressées. On assista également à l'identification des polypeptides synthétisés au sein de la mitochondrie, la présence de ribosomes au sein des organites ayant été établie quelques années auparavant. Avec les années 80 et la montée en puissance des techniques de biologie moléculaire, l'usage spécifique des codons lors de la traduction mitochondriale fut passé au crible, l'ADNmt humain totalement séquencé en 1981 et les gènes de l'ADNmt de mammifères identifiés. Mais c'est aussi les mécanismes qui sous-tendent l'émergence des maladies mitochondriales

qui devinrent un nouveau sujet de préoccupation. En effet, bien que l'ADNmt ait été identifié, les cliniciens ne prêtèrent guère attention à ce qu'ils considéraient comme une relique génétique. Le concept de maladie mitochondriale ayant été introduit en 1962 par Rolf Luft (**Figure 2**), ce n'est pourtant qu'en 1985 que l'on proposa une classification générale de ces pathologies et il fallut attendre 1988 pour que l'on identifie pour la première fois les causes d'une de ces pathologies, reliée à une large délétion de l'ADNmt. A partir de là, les descriptions pathologiques associées à des altérations du génome mitochondrial s'enchaînèrent à raison d'une dizaine de mutations par an pour mener jusqu'à aujourd'hui à la description de plus de 250 mutations dans l'ADNmt.

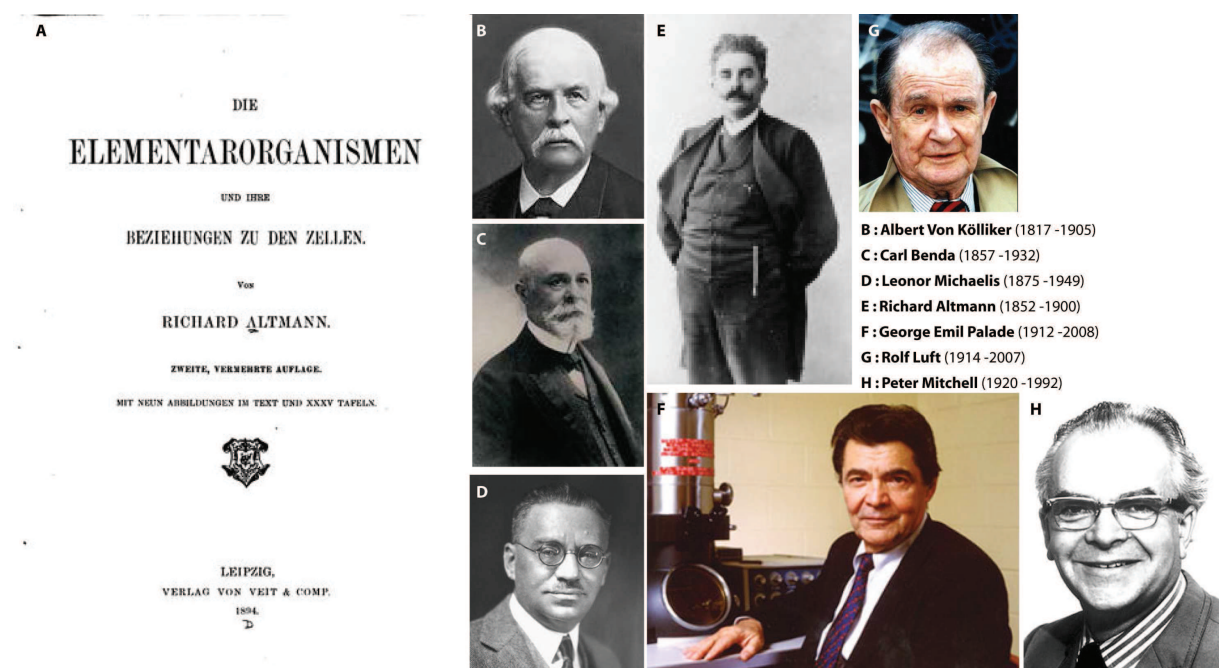


Figure 2 : Quelques grandes figures des mitochondries

(A) La couverture du livre de Richard Altmann « Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen » (les organismes élémentaires et leurs relations aux cellules) publié en 1890. (www.books.google.fr) (B-H) Quelques grands scientifiques ayant participé à la compréhension des mitochondries. (www.wikimédia.org)

Avec les années 1990-2000, on entre de plain-pied dans ce que l'on pourrait appeler l'ère moléculaire avec la PCR, le séquençage à haut débit, les méthodes de cristallisation et autres techniques de biologie moléculaire permettant entre autre le séquençage de l'ADNmt de levure ou la résolution de la structure des différents complexes respiratoires.

Durant ces années, les données s'accumulent et on assiste alors à une véritable explosion des recherches menées sur les mitochondries, en témoignent le taux de publication sur ce sujet qui a doublé en 10 ans (**Figure 3**).

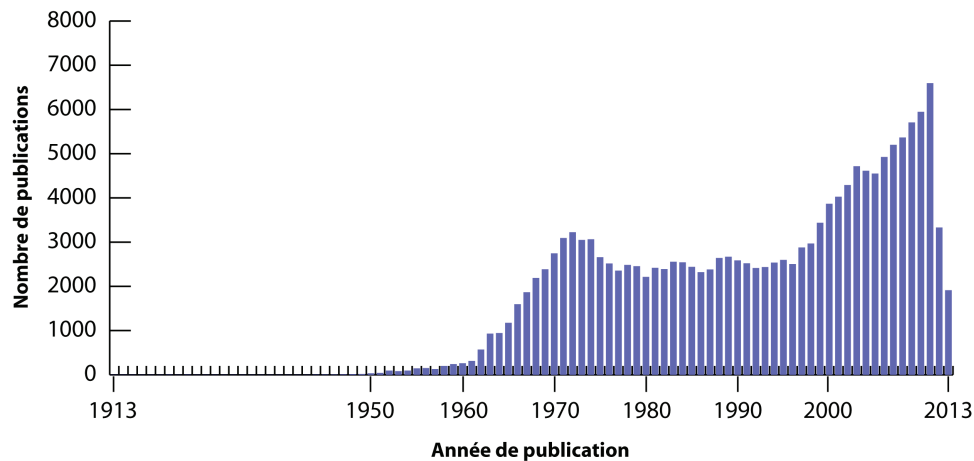


Figure 3 : Taux de publication dans PubMed d'articles portant sur les mitochondries de 1913 à nos jours

Ce graphique montre le nombre de publications traitant des recherches menées sur les mitochondries. On peut noter un pic dans les années 1970-1975 avec une augmentation radicale de 200% depuis les années 2000. (www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)

Avec ce bref passage en revue des découvertes majeures qui ont jalonné ce siècle de recherches sur les mitochondries, brièvement résumé avec la **Figure 4**, nous avons vu que le chemin parcouru depuis la découverte des bioplastes a été plus que fructueux, mais que, espérons-le, le meilleur reste à venir.

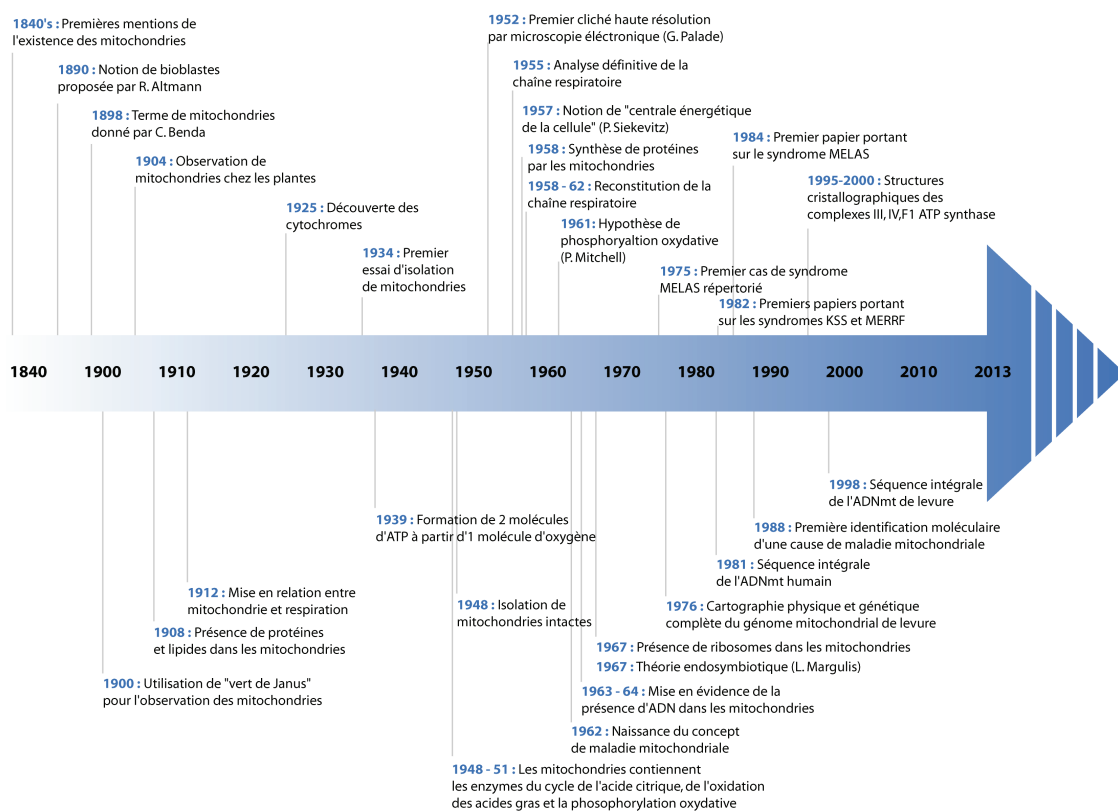


Figure 4 : Frise chronologique des découvertes majeures sur les mitochondries

Cet axe présente de manière non exhaustive les découvertes majeures et les avancées réalisées dans la compréhension des mitochondries depuis les années 1840s jusqu'aux années 2000

Après avoir fait un état des lieux sur les connaissances accumulées à propos des mitochondries lors de ce siècle, nous allons nous intéresser aux recherches effectuées en la matière les 15 dernières années et présenter ces organites plus en détails.

2. Origine

Lorsque Richard Altmann fit la découverte des mitochondries, il les décrivit comme des colonies bactériennes semblant être animées par une force vive. Ces observations amenèrent de nombreux questionnements sur l'origine des mitochondries. Au cours du 19^{ème} siècle, le botaniste Andreas Schimper remarqua l'étrange similarité entre les cyanobactéries et les chloroplastes qu'il étudiait et suggéra que les plantes étaient issues de la symbiose de 2 organismes distincts et qu'ils avaient évolués jusqu'à atteindre leur forme actuelle. Cette idée fut soutenue par les études d'un autre botaniste russe, Konstantin Mereschkowski, qui proposa l'idée de symbiogenèse (Vargas-Parada, 2010). Mais ce n'est véritablement qu'en 1966, qu'une microbiologiste américaine du nom de Lynn Margulis avança une hypothèse connue aujourd'hui sous le terme de théorie endosymbiotique (Sagan, 1967). Par cette théorie, Lynn Margulis postula que les mitochondries seraient apparues il y a environ 2 milliards d'années suite à l'incorporation par endocytose d'une α -protéobactérie par une archae (**Figure 5**). Cette théorie stipule que ce phénomène résulte de la symbiose ou de manière plus générale, d'une synergie entre des formes de vie qui auraient acquis des capacités particulières telles le stockage d'énergie sous forme chimique dans le cas des mitochondries ou lumineuse chez les chloroplastes. Ces capacités seraient ensuite partagées, transmises puis héritées dans l'optique de créer une nouvelle forme de vie ayant développé un degré de complexité supérieur. Bien que largement controversée lors de son postulat, cette théorie est aujourd'hui celle la plus communément acceptée dans la communauté scientifique, des preuves biochimiques, phylogénétiques ou structurales plus substantielles ayant été ajoutées au dossier. Parmi elles, l'existence d'un génome propre à la mitochondrie, la présence d'une double membrane dont la composition lipidique diffère de ce que l'on trouve dans le reste de la cellule, leur mode de prolifération par fission, une ressemblance structurale les rapprochant des protéobactéries...

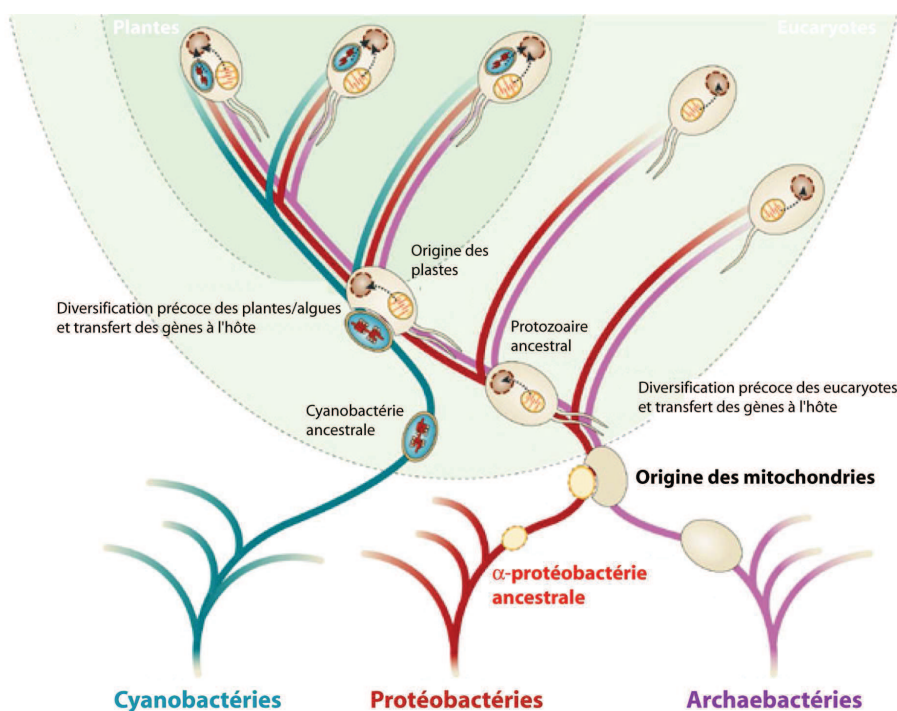


Figure 5 : La théorie endosymbiotique

Les mitochondries sont issues d'un processus d'endocytose d'une α -protéobactérie (rouge) par une archaebactérie (violet). Modifié de (Timmis et al., 2004)

3. Structure

Si l'on devait dresser le portrait robot d'une mitochondrie, on pourrait la décrire comme un organe subcellulaire de forme ovoïde, d'une longueur de 1 à 10 μm et d'un diamètre de l'ordre du micron présent en un millier d'exemplaires dans la cellule. Mais une telle définition serait quelque peu réductrice tant les mitochondries peuvent être de nombre, de forme et de taille variable selon le tissu dans lequel on les trouve (**Figure 6**). Elles possèdent une double membrane composée de la membrane externe et de la membrane interne, toutes deux séparées par l'espace inter-membranaire large d'une vingtaine de nanomètres (Perkins et al., 1997).

Composée à 60% de protéines et 40% de lipides dont du cholestérol, la membrane externe est ponctuée par la présence de canaux transmembranaires, encore appelés porines, dépendants du voltage (VDAC pour Voltage-Dépendant Anion Channel) la rendant semi-perméable aux molécules hydrophiles d'une masse molaire inférieure à 10 kDa (anions, cations, acides gras, nucléotides...). Cette enveloppe externe possède également des

complexes protéiques de type TOM (Translocase of Outer Membrane) qui sont la principale porte d'entrée dans les mitochondries des pré-protéines, qui seront ensuite conduites jusqu'à la matrice ou distribuées vers l'une ou l'autre membrane.

La membrane interne quant à elle, se replie en de multiples invaginations au sein de la matrice (**Figure 6**). Appelées crêtes mitochondriales (ou *cristae*), ces structures observables par microscopie électronique permettent d'accroître la surface de la membrane interne et par extension, le nombre de complexes respiratoires qui y sont enchâssés. Via cette organisation, l'activité respiratoire des mitochondries s'en retrouve donc augmentée.

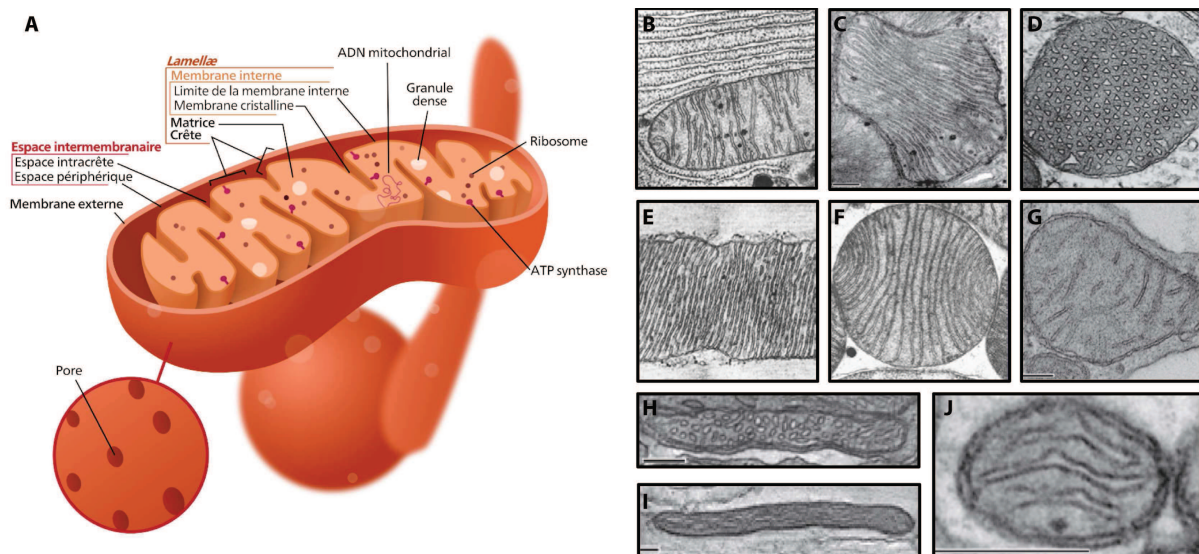


Figure 6 : Structure générale de la mitochondrie

(A) Représentation schématique de l'organisation structurale des mitochondries (source www.wikimédia.org). (B-J) Diversité architecturale et fonctionnelle des mitochondries. Le panel présente des mitochondries de pancréas (B), cœur (C), astrocyte (D), muscle (E), tissu adipeux brun (F), foie (G), rétine (H), nerf périphérique (I) et cerveau (J). Modifié de (Neupert, 2012; Vafai and Mootha, 2012).

La membrane interne est composée à 75% de protéines et à 25% de phospholipides, et plus particulièrement de phosphatidylcholine et cardiolipine. Cette dernière représente 20% des lipides totaux et est uniquement retrouvée dans les membranes mitochondriales où elle assure l'organisation structurale des complexes respiratoires (Zhang et al., 2002). Du point de vue de l'import, la membrane interne est pourvue de complexes TIM (Translocase of Inner Membrane) prenant le relais du complexe TOM pour l'introduction des protéines destinées à la matrice ou à leur intégration au sein de la membrane. On trouve également des ANT (Adenine Nucleotide Translocase) pour le passage de l'ADP entrant et de l'ATP sortant, des transporteurs de type symport pour l'import de pyruvate ou de phosphate inorganique ou bien encore des CACT (Carnitine AcylCarnitine Translocase). Les métabolites

du cycle de Krebs utilisent pour leur part des protéines de transport spécifiques (Palmieri et al., 2011).

Séparant ces 2 barrières lipidiques, l'espace inter-membranaire est plus qu'une zone de transit car on y trouve de nombreuses enzymes dont le cytochrome c ou un groupement d'enzymes qui métabolisent l'ATP (créatine kinase, myokinase et nucléoside diphosphate kinase). Enfin au cœur de la mitochondrie se trouve la matrice, qui renferme une pléiade d'enzymes impliquées dans le cycle de Krebs, la β -oxydation des acides gras, le cycle de l'urée... mais c'est également l'écrin de l'ADNmt et des différents composants nécessaires aux processus de réplication-transcription-traduction.

Du point de vue de leur organisation, les mitochondries ne sont en rien des organites isolés et loin de cette image d'Épinal, il a été démontré que leurs membranes interagissent et s'organisent en un large réseau hautement dynamique se déployant dans toute la cellule. Soumis à des processus de fusion/fission permanents lors de la division cellulaire ou pour répondre aux besoins énergétiques de la cellule, les mitochondries doivent adapter leur nombre (étant en moyenne autour de 1 000/cellule) aux conditions physiologiques (Detmer and Chan, 2007) (Figure 7).

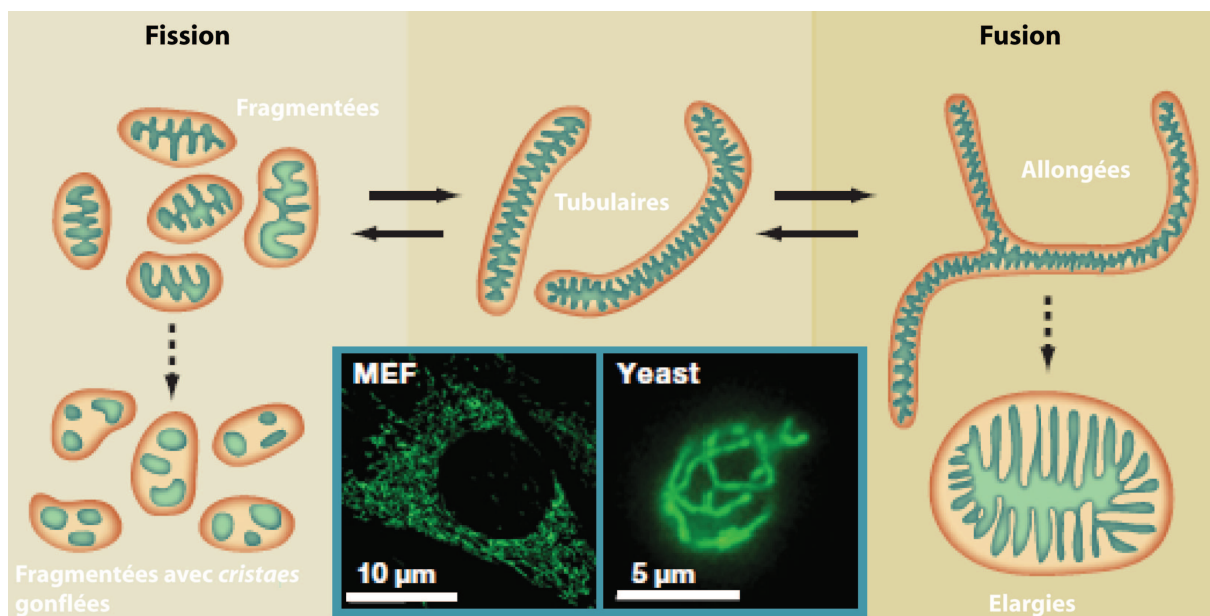


Figure 7 : Organisation dynamique des mitochondries

Les mitochondries peuvent adopter différentes morphologies en fonction de leur dynamique. Elles seront plutôt fragmentées lors des processus de fission (à gauche) tandis qu'on aura une structure plus allongée lors de leur fusion (à droite). Adapté de (Tamura et al., 2011).

Pour soutenir cette dynamique et guider leurs déplacements, les mitochondries s'appuient sur le cytosquelette (actine, microtubules et filaments intermédiaires) de la cellule (Hollenbeck and Saxton, 2005). Durant ces mouvements, des mitochondries peuvent entrer en collision et fusionner, ce qui conduit alors à un accroissement de leur surface et une réorganisation du réseau mitochondrial.

4. Fonctions

4.1 Voies métaboliques

Comparable au moteur de la cellule, les mitochondries sont à l'origine du processus de respiration et assurent la production d'énergie sous une forme assimilable par la cellule : l'ATP. Mais leur rôle ne s'arrête pas là, elles sont également impliquées dans bon nombre de processus cellulaires allant de la thermogenèse à l'apoptose, en passant par l'homéostasie du calcium et du fer ou la biosynthèse des stéroïdes. Mais revenons-en à la fonction première des mitochondries, à savoir la respiration. Au centre de ce processus, nous trouvons un ensemble de 5 complexes protéiques (**Figure 8**) : la NADH-ubiquinone réductase (complexe I), la succinate-ubiquinone réductase (complexe II), l'ubiquinone-cytochrome réductase (complexe III), la cytochrome oxydase (complexe IV) et l'ATP synthase (complexe V).

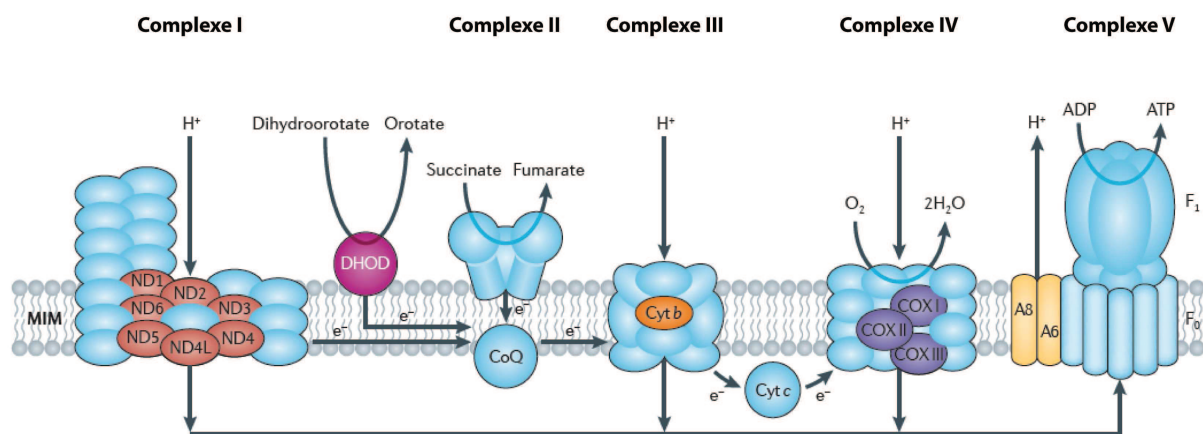


Figure 8 : Organisation de la chaîne respiratoire

Les 5 complexes qui forment la chaîne respiratoire sont enchâssés dans la membrane interne des mitochondries (**MIM**). Les sous-unités codées par le noyau sont en bleu clair tandis que les sous-unités encodées par le génome mitochondrial sont en rouge (complexe I), orange (complexe III), bleu foncé (complexe IV) et jaune (complexe V). Seule exception, la dihydroorotate déhydrogénase (DHOD ; en rose) impliquée dans la synthèse des pyrimidines, permet également de fournir des électrons au coenzyme Q. Adapté de (Schon et al., 2012).

Imbriqué au sein de la membrane interne des mitochondries, cet ensemble protéique constitue ce que l'on appelle la chaîne respiratoire, qui assure la production d'ATP via le processus de phosphorylation oxydative. Sous ce terme sont regroupés les processus de couplage des métabolites en CO_2 et H_2O et de production d'énergie sous forme d'ATP. Mais pour comprendre plus en détails ce mécanisme et ce qui se cache derrière ces réactions, remontons à sa source.

Tout commence par la formation d'acétyl-CoA. Pour cela, plusieurs sources d'énergie puisées dans l'alimentation peuvent être utilisées comme des acides gras et dans de très rares cas des protéines. Mais la principale source d'énergie reste le glucose, qui va tout d'abord être transformé en pyruvate lors de la glycolyse, avant d'être amené au sein de la mitochondrie où il sera converti en l'acétyl-CoA par la pyruvate déshydrogénase. Durant cette étape, 2 molécules d'acétyl-CoA vont être produites et intégrées le cycle de Krebs. Autre possibilité, les acides gras constituent également une source pour la production d'acétyl-CoA, en particulier pour les muscles squelettiques et cardiaques, même si pour ce dernier, le mécanisme réactionnel est quelque peu différent. Les acides gras possédant un nombre de carbone supérieur ou égal à 8 seront convertis en un précurseur, l'acyl-CoA qui est alors dégradé dans la matrice mitochondriale par 4 réactions enzymatiques séquentielles regroupées sous le terme de β -oxydation, et donnant alors l'acétyl-CoA.

Une fois l'acétyl-CoA produit, celui-ci est injecté dans le cycle de Krebs qui assure lors de chaque cycle, la production de NADH et de FADH_2 , coenzymes réduits qui seront alors récupérés par la chaîne respiratoire (**Figure 9**). Notons que selon le type de molécule dégradée, le nombre d'acétyl-CoA et donc de coenzymes réduits est variable. Il sera plus important pour des acides gras que pour du glucose. Les coenzymes produits lors du cycle de Krebs et des réactions associées à la glycolyse et la β -oxydation vont être réoxydés via la perte d'un hydrogène, qui va lui-même se dissocier en un proton et en un électron. Porteurs d'un haut potentiel énergétique, ces électrons vont ensuite être transférés à la chaîne respiratoire.

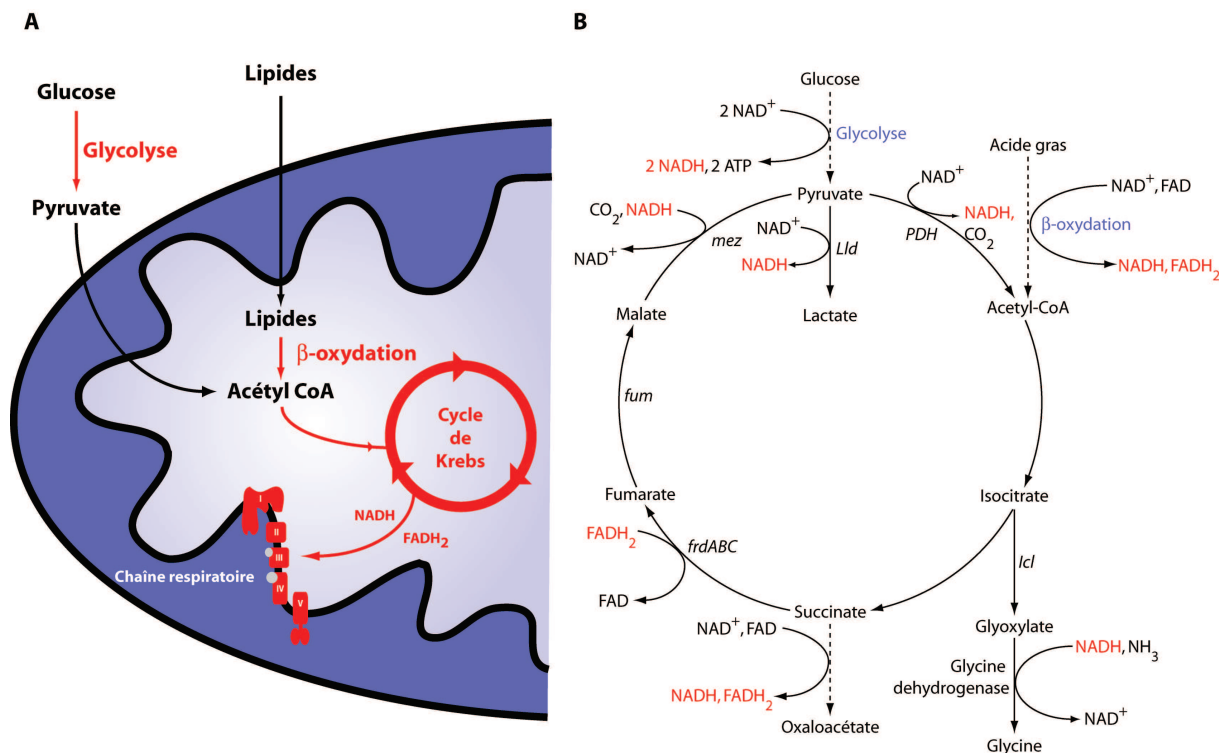


Figure 9 : Glycolyse, β -oxydation et cycle de Krebs

(A) Représentation schématique des voies de glycolyse et de β -oxydation. Le glucose et les acides gras sont convertis en acétyl-CoA avant d'être intégrés dans le cycle de Krebs, où ils vont générer la production de NADH et FADH₂ qui sont transférés vers la chaîne respiratoire. (B) Représentation schématique du cycle de Krebs. Modifié de (Boshoff and Barry, 2005)

4.2 Phosphorylation oxydative

Comme mentionné précédemment, cet ensemble de 5 complexes protéiques est enchâssé dans la membrane interne des mitochondries. 2 transporteurs lui sont associés, à savoir le coenzyme Q (CoQ) et le cytochrome c. Tous deux chargés d'établir un pont pour les électrons, respectivement entre les complexes I et III et les complexes III et IV. D'un point de vue fonctionnel, le coenzyme Q est une quinone qui diffuse librement dans la membrane interne, tandis que le cytochrome c est une hémoprotéine associée à la membrane interne et faisant face à l'espace inter-membranaire.

En ce qui concerne les électrons générés lors de la réoxydation du NADH et du FADH₂. Guidés par le potentiel d'oxydo-réduction qui détermine le sens de leur transfert, les électrons circulent d'un complexe à l'autre. Sur leur passage, ils induisent alors l'oxydation successive de chaque complexe. C'est donc mus par le potentiel d'oxydo-réduction, que les électrons ont une tendance naturelle à passer du complexe I convertissant le NADH (-320

mV) en NAD^+ vers le complexe IV où ils seront au final acceptés par une molécule d'oxygène réduite en une molécule d'eau (+816 mV). Avec ce flux d'électrons, c'est également un gradient électrochimique qui apparaît, les protons étant transloqués vers l'espace inter-membranaire. Ce gradient se traduit de 2 manières. Tout d'abord par un potentiel membranaire (noté $\Delta\Psi$) élevé avoisinant les -150 mV, ainsi que par un gradient chimique dû à l'acidification de l'espace inter-membranaire suite à l'accumulation de protons. Ces derniers ont une forte tendance à rejoindre la matrice, mais en sont empêchés par l'imperméabilité de la membrane interne. Leur seule issue est alors fournie par l'ATP synthase (ou complexe V) qui est un complexe protéique membranaire permettant le retour des protons au sein de la matrice. Mais ce mouvement de protons n'est pas gratuit, l'ATP synthase tirant parti de ce flux pour exercer son activité et convertir l'ADP importé du cytosol en ATP qui est lui expulsé hors de la mitochondrie.

Avec cet engrenage réactionnel, la mitochondrie assure environ 95% de l'apport énergétique de la cellule, 60% des nutriments absorbés servant cette cause alors que les 40% restant sont tout simplement dissipés sous forme de chaleur. En d'autres quantités, on estime à environ 60 kg la production journalière d'ATP pour un adulte de corpulence moyenne. Du point de vue des sources énergétiques, ce sont les acides gras qui semblent être de prime abord le substrat le plus adapté, une mole de palmitate permettant de produire 106 moles d'ATP alors qu'une mole de glucose n'en génère que 32. En revanche, si l'on rapporte ces valeurs au nombre de carbones, on constate que c'est en fait le glucose qui possède le plus haut rendement énergétique avec 5,3 molécules d'ATP contre 4,8 molécules d'ATP pour le palmitate.

Mais il est un cas particulier, celui du muscle cardiaque dont les besoins énergétiques sont des plus conséquents. Le cœur consomme environ 1 mM d'ATP/seconde et lors d'exercices intenses, il lui faut un système adapté qui lui permette de transférer efficacement de l'énergie. Pour cela, le système de créatine kinase permet de convertir, en présence de créatine, l'ATP produit par les mitochondries en une forme intermédiaire qu'est la phosphocréatine. Ce métabolite intermédiaire va être exporté vers le cytosol où il va activer la créatine kinase qui assure sa reconversion en ATP. Ainsi, nous allons avoir une succession de couplages réactionnels qui vont permettre un transport rapide et efficace de l'ATP vers les myofilaments.

Dérivés radicalaires de l'oxygène, les ROS (Reactive Oxygen Species) sont des produits secondaires du mécanisme de phosphorylation oxydative générés au niveau des complexes I et III. Au cours de la respiration cellulaire, l'oxygène est progressivement réduit par un apport contrôlé de 4 électrons et va conduire comme nous l'avons vu à la production d'une molécule d'eau. Malheureusement, cette réaction peut être incomplète et donner alors naissance à différentes espèces hautement réactives. L'oxygène peut alors générer un anion superoxyde (O_2^{\bullet}), du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) ou bien encore un radical hydroxyle (OH^{\bullet}) selon qu'il gagne 1, 2 ou 3 électrons.

Bien qu'ils jouent un rôle important dans la signalisation cellulaire et l'homéostasie, ces composés ont également leur revers et peuvent être dommageables pour la cellule. Même si la mitochondrie dispose de systèmes de détoxification sous la forme d'enzymes (superoxyde dismutase, catalase, glutathion peroxydase...) ou de petites molécules (vitamine E, vitamine C...), des défaillances peuvent survenir et conduire à une augmentation de la concentration en ROS. Connue sous le terme de stress oxydatif, l'accumulation de ces espèces hautement réactives va les faire réagir avec les lipides (peroxydation radicalaire), les protéines (notamment celles comportant des groupements sulfhydryles qui vont être oxydées et inactivées) et l'ADNmt voisin. Mis en présence de ce dernier, les ROS vont y provoquer de nombreux dommages dont des cassures simples et doubles brin, des modifications de bases ou des pontages avec les protéines (Balaban et al., 2005).

5. Génétique mitochondriale

L'une des caractéristiques principales des mitochondries est qu'elles possèdent leur propre génome. Cette autonomie génétique avait été avancée dès la découverte de ces organites mais il fallut attendre le milieu des années 60 pour que la preuve soit apportée (Nass and Nass, 1963). Cette propriété est retrouvée dans tout le règne vivant, même si l'organisation structurale de cet ADNmt aura évolué différemment en fonction des espèces. Il peut ainsi être circulaire, linéaire, simple ou double brin et sa taille peut varier de quelques kilobases à plus de 2 000 kb pour certaines espèces de plantes (Burger et al., 2003). Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à un des génomes qui nous concerne au plus haut point : celui de l'Homme.

5.1 L'ADNmt mitochondrial humain

Lorsqu'on le compare avec ceux d'autres espèces, on constate que le génome mitochondrial humain est l'un des plus petits du règne vivant. Avec une capacité codante d'environ 16,6 kb, cet ADN circulaire bicaténaire ne contient que 37 gènes répartis de la manière suivante : 13 gènes essentiels encodent des sous-unités des différents complexes respiratoires, 22 ARNt et 2 ARN ribosomiques (ARNr 12S et ARNr 16S) qui interviennent lors de la traduction des 13 polypeptides préalablement cités (**Figure 10**).

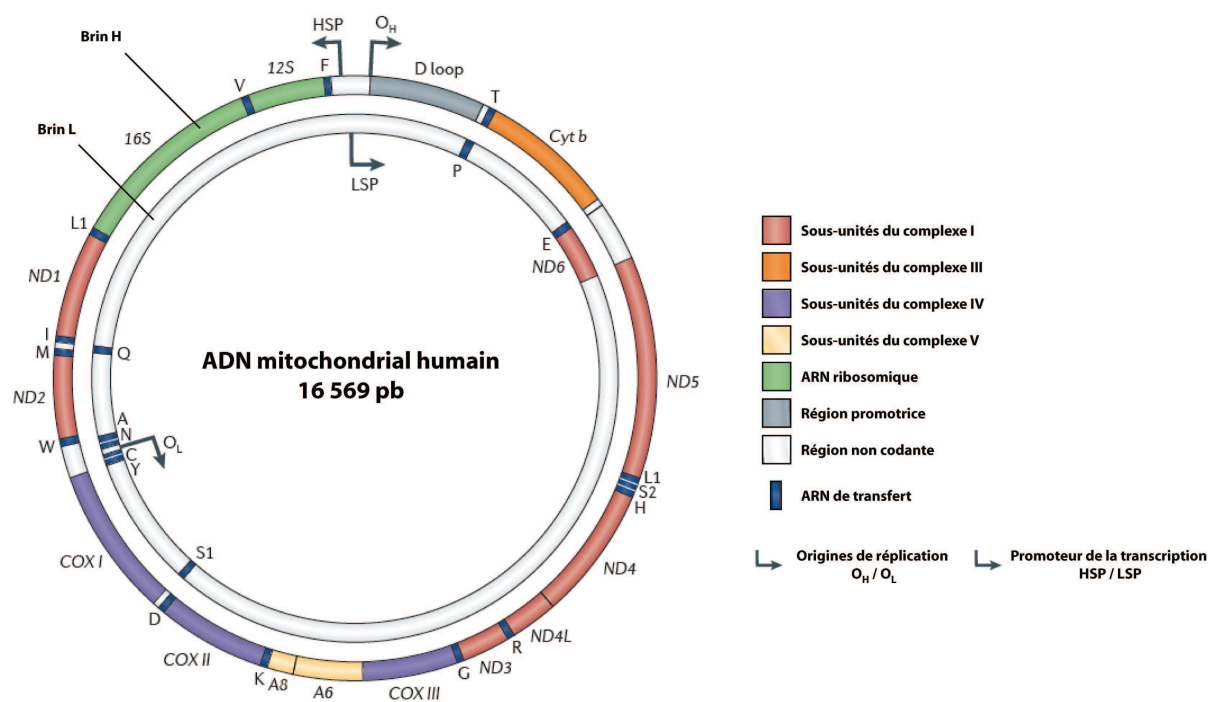


Figure 10 : Organisation de l'ADN mitochondrial humain

Carte génétique de l'ADNmt humain. Les 37 gènes qu'il encode sont représentés pour les 2 brins (L et H) avec à droite le code couleur pour chaque catégorie de gènes. Adapté de (Schon et al., 2012).

Cet ADNmt ne possède pas d'introns et ne contient que 2 régions non codantes situées à proximité des origines de réplication O_H et O_L. Cette nomenclature de H et L fait référence à la différence de densité observée dans un gradient de chlorure de césium pour brin léger (L pour Light) et le brin H (H pour Heavy), ce dernier étant plus riche en guanine. L'ADNmt est présent à une hauteur d'environ 1 000 copies par cellule, ce nombre pouvant bien entendu fortement varier en fonction du type cellulaire considéré. Bien qu'elles possèdent leur propre génome, les mitochondries restent sous une double dépendance génétique, les protéines encodées par le génome mitochondrial ne représentant qu'environ

15% des protéines constitutives de la chaîne respiratoire. Le reste d'entre elles ainsi que les gènes associés aux autres fonctions mitochondriales sont l'apanage du génome nucléaire, la mitochondrie devant alors importer les protéines synthétisées. Mais si la majorité des gènes associés à des fonctions mitochondriales sont conservés au sein du noyau, on peut se demander pourquoi la mitochondrie en conserve-t-elle encore en son sein ?

Plusieurs explications à cela. Tout d'abord la nature hydrophobe des protéines, qui si elles étaient synthétisées hors de la mitochondrie auraient le plus grand mal à franchir la double membrane mitochondriale. Les meilleurs exemples résident dans le cytochrome b et la protéine COX I, qui sont les protéines les plus hydrophobes que l'on puisse trouver au sein de la mitochondrie. On pourrait également penser que le produit de ces différents gènes seraient toxiques s'ils étaient présents dans le cytosol. Enfin, ces protéines pour acquérir leur fonction définitive pourraient être soumises à un contrôle fin de la part du noyau (de Grey, 2005).

Pour les gènes d'ARNt, une autre explication est avancée et trouve son explication dans l'existence d'un code génétique propre aux mitochondries. Ces dernières ayant pris le parti de conserver au sein de leur génome les 13 protéines essentielles dont nous venons de parler, elles ont également dû s'assurer de pouvoir en assurer la traduction. Pour cela, elles ont donc préservé ce jeu minimal d'ARNt, ainsi que les 2 ARNr 12S et 16S.

5.2 Le nucléoïde

Dépourvu d'histones qui assurent sa compaction, l'ADNmt est pourtant recouvert de protéines qui permettent son organisation au sein de complexes ovoïdes appelés nucléoïdes, présents en plusieurs centaines d'exemplaires au sein de la cellule (**Figure 11**). D'un diamètre d'environ 100 nm, ce type de structure recèle en moyenne 3 copies d'ADNmt (Brown et al., 2012). Mais ce nombre peut facilement varier de 2 à 8 copies d'ADNmt selon à nouveau, le type de cellule étudié (Bogenhagen, 2012). Cette estimation se fait généralement sur la base de la mesure de l'intensité de fluorescence des protéines associées à l'ADNmt, la première démonstration ayant été faite grâce à l'hélicase Twinkle (Spelbrink et al., 2001).

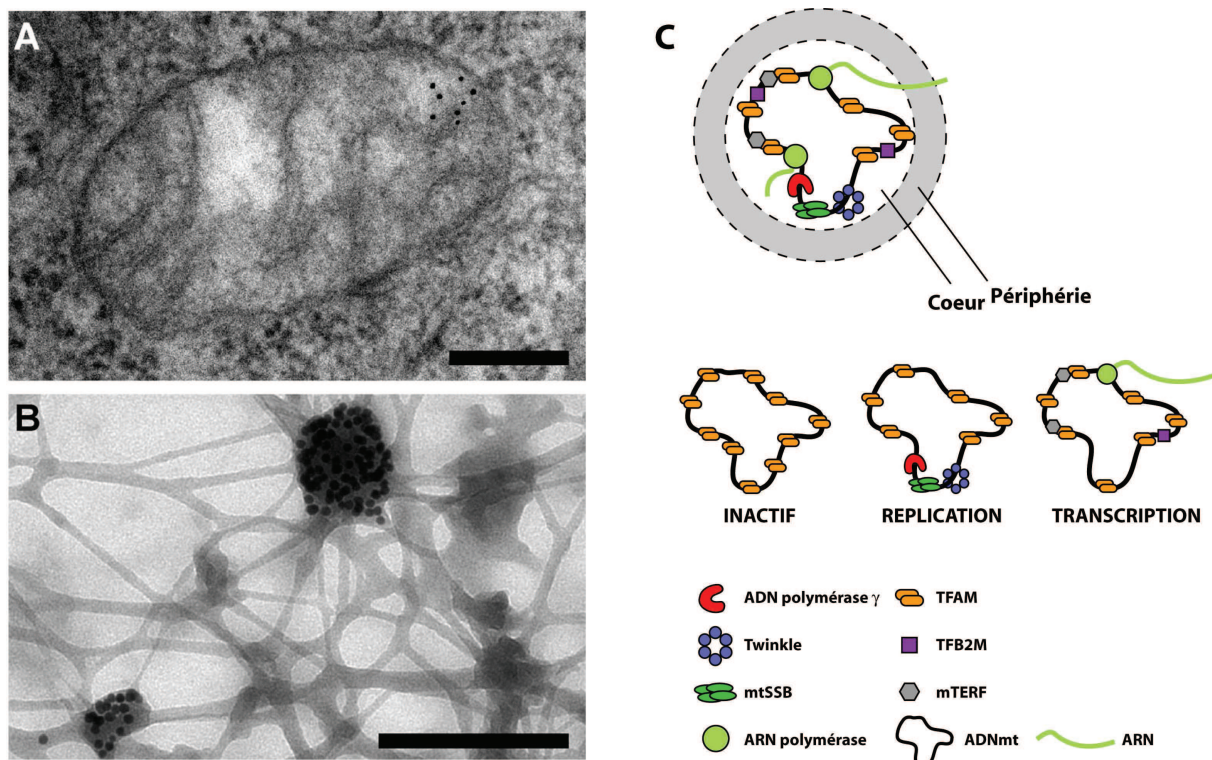


Figure 11 : Organisation structurale du nucléoïde

(A-B) ADNmt vu par microscopie électronique (échelle : 200 nm). (A) Section cytoplasmique. L'ADNmt localisé à proximité de la membrane sous forme de légères ponctuations est marqué grâce à des billes d'or. (B) Vue d'ensemble du cytoplasme. L'ADNmt visible sous forme de petits foyers groupés reste associé au cytosquelette après extraction des membranes mitochondriales et des protéines cytoplasmiques (Iborra et al., 2004) (C) Représentation des différents facteurs constituant le nucléoïde et impliqués dans les processus de réplication ou transcription. On peut considérer 2 zones dans la structuration du nucléoïde, le centre (ou cœur) où sont regroupés les facteurs principaux et la périphérie où l'on peut trouver des facteurs secondaires. Modifié de (Bogenhagen et al., 2008)

Du point de vue de la composition du nucléoïde, la protéine la mieux caractérisée et la plus abondante (environ 1 000 copies/ADNmt) est le facteur de transcription TFAM. Par sa fixation, TFAM altère la torsion du génome en s'enroulant autour de la molécule d'ADNmt toutes les 16 pb, ce qui permet d'obtenir ce niveau de compaction. TFAM a pu être rapproché de son homologue chez la levure, la protéine *abf2p* qui bien que ne montrant aucun impact sur la transcription, est suffisamment abondante pour recouvrir l'ADNmt. Les secondes protéines retrouvées au sein des nucléoïdes, sont les mtSSB. Se rapprochant de leurs équivalents bactériens, les mtSSB ont pour fonction de recouvrir les régions simple brin de l'ADNmt lors du processus de réplication et d'éviter la formation de structures secondaires après le passage de l'hélicase.

Des expériences de cross-linking (Bogenhagen et al., 2008) et de purification par immuno-affinité (Wang and Bogenhagen, 2006) ont permis de mettre au jour d'autres

facteurs associés à l'ADNmt humain. A TFAM et aux mtSSB on peut ajouter l'ADN polymérase γ , l'hélicase Twinke, une ARN polymérase, la topoisomérase I, le facteur de transcription TFB2M (Litonin et al., 2010) et enfin, le facteur mTERF1. Ce dernier est impliqué dans l'arrêt de la transcription et la régulation de la réplication et semble être le facteur qui occupe la plus grande surface du génome. D'autres études ont permis de mettre en évidence que les variants mTERF2 (Pellegrini et al., 2009) et mTERF3 (Park et al., 2007) étaient aussi détectés dans ces structures. Lorsque l'on compare la composition des nucléoides humains à celle des levures, on peut noter chez ces dernières, la présence d'une trentaine de protéines formant le nucléoïde. Il n'est donc pas impossible que la liste présentée ici pour l'Homme ne soit pas exhaustive et puisse voir ses rangs grossis au cours des prochaines années. En effet, des facteurs connus pour leur implication dans les processus d'expression du génome (DNA ligase III, RNase H...) et présents en moindre abondance peuvent être masqués par les protéines les plus représentées. Enfin d'autres facteurs n'interagissant pas directement avec l'ADNmt peuvent également être retrouvés, comme des chaperonnes, des protéases, des protéines ribosomiques, des enzymes du métabolisme lipidique, ou encore des protéines intervenant dans la fixation au cytosquelette (Bogehagen, 2012). Récemment, il a également été montré que la protéine ATAD3, l'un des partenaires majeurs du ribosome mitochondrial était retrouvé lors de la purification de nucléoides, suggérant une étroite association avec le mécanisme de traduction (He et al., 2012).

Au vu de la composition du nucléoïde, on comprend que cette structure soit impliquée dans la compaction et la protection du génome mais qu'elle permette également de centraliser l'ensemble des processus liés à son expression (réplication, réparation, transcription...).

6. Le dogme génétique chez la mitochondrie

6.1 Réplication

6.1.1 Le réplisome

Nous avons vu dans le chapitre précédent qu'une foule de facteurs étaient associés à l'ADNmt dans la constitution du nucléoïde. La plupart d'entre eux appartiennent au réplisome, c'est-à-dire à un ensemble de protéines travaillant de manière coordonnée à la réplication du génome.

Identifiée en 1972 ([Fridlender et al., 1972](#)), la première d'entre elles est l'ADN polymérase γ qui arbore une activité polymérase, exonucléase 3'-5' et lyase 5'-deoxyribose phosphate. Elle se distingue des autres polymérases cellulaires par une haute activité, l'utilisation *in vitro* de matrice ARN et par sa résistance à l'aphidicoline. C'est un hétérotrimère composé de la sous-unité catalytique POL γ A (140 kDa) et de 2 sous-unités accessoires POL γ B (55 kDa) qui ont la capacité de se lier à des portions d'ADN double brin d'au minimum 45 pb. Cette association entre les sous-unités permet d'accroître la processivité de la sous-unité POL γ A.

Le second composant est l'hélicase C10orf2, plus connue sous le nom de Twinkle à cause de l'aspect ponctué observé lorsqu'elle est associée à l'ADNmt ([Spelbrink et al., 2001](#)). Similaire à la primase/hélicase du phage T7 et aux autres hélicases en anneau, Twinkle est un hexamère qui assure des fonctions similaires à celles de ses homologues même si elle a perdu son activité primase. Dépendante de l'ATP, elle assure ainsi la relaxation des parties double brin de l'ADNmt dans la direction 5'-3', et trouve en une extrémité 5' d'ADN simple brin orné d'une courte queue en 3', un substrat spécifique pour catalyser sa réaction.

Pour consolider le travail effectué par Twinkle, le réplisome fait intervenir de petites protéines que nous avons brièvement évoquées : les mtSSB (pour mitochondrial Single Strand DNA- Binding). D'une masse molaire de 15 kDa environ, ces protéines s'organisent en tétramères ([Kaguni, 2004](#)) et vont servir de bobine à l'ADNmt, qui sur une distance de 50 à 70 pb va s'enrouler autour d'elles, empêchant ainsi son retour à une forme double brin. Ce type de protéines est retrouvé lors de la réplication nucléaire et chez de nombreux organismes (drosophile, levure, souris...) attestant de leur rôle clé dans la réplication de

l'ADN. On constate également que les mtSSB jouent un rôle sur la processivité de la machinerie de réplication, celle-ci voyant son activité de synthèse passer de 180 pb/min à 270 pb/min lorsque la polymérase et l'hélicase γ sont associées. Néanmoins, cet effet a ses limites, Twinkle étant incapable de dérouler des duplexes d'ADN supérieurs à 55 pb.

Associés, ces 3 composants constituent le réplisome minimal (**figure 12**) dont la composition a été démontrée *in vitro* (Korhonen et al., 2004) mais auquel on peut adjoindre des protéines supplémentaires telles des topoisomérases (ex. : TOP1 qui semble être l'unique représentante chez les vertébrés), pour soulager l'ADNmt des torsions engendrées lors de la réplication. Parmi ces protéines, on peut trouver une primase dont le rôle serait alors endossé par la polymérase MTRPOL même si celle-ci n'est pas essentielle en fonction du mode de réplication considéré, aspect sur lequel nous allons revenir dans un instant. Enfin, à cette primase, peut être associée la RNase H1 qui a pour fonction d'éliminer les primers générés lors l'initiation de la réplication.

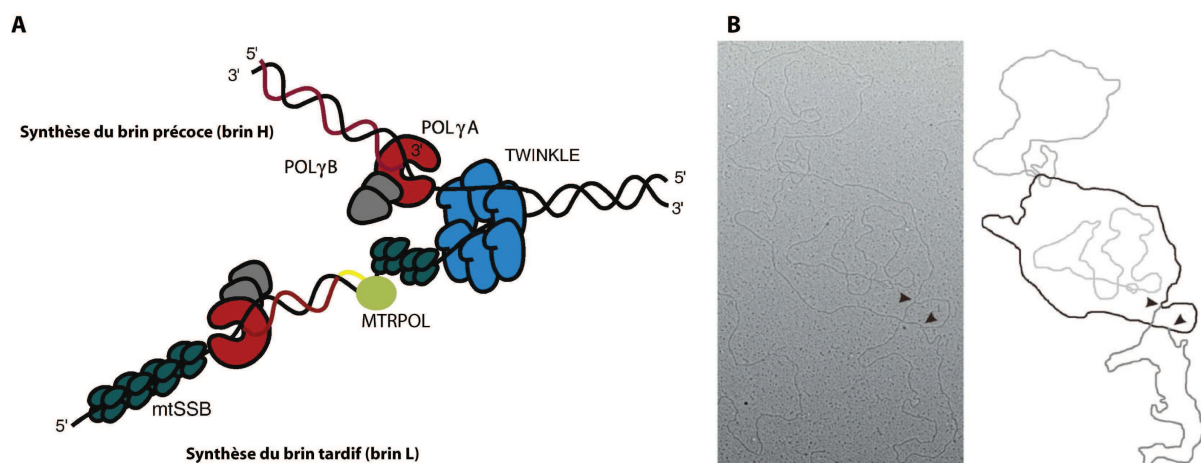


Figure 12 : Réplisome et réplication de l'ADNmt

(A) La machinerie de réplication de l'ADNmt. Le réplisome minimal se compose de la polymérase γ (en rouge), de l'hélicase Twinkle (en bleu) et des protéines de liaison à l'ADN mtSSB (en vert foncé). Sur ce schéma est également représenté la MTRPOL (vert clair). (Wanrooij and Falkenberg, 2010) (B) Image de microscopie électronique d'ADNmt humain de cellules HEK 293. On peut observer la réplication de l'ADNmt, les fourches de réplication étant localisées par des flèches. (Pohjoismaki and Goffart, 2011)

6.1.2 Modèles de réplication

Comme nous venons de le voir, les facteurs impliqués dans la réplication de l'ADNmt sont, à quelques exceptions près, bien caractérisés, mais le mécanisme par lequel la réplication s'effectue est une autre histoire ou plutôt d'autres histoires. Source d'intenses débats, plusieurs modèles sont avancés et régulièrement alimentés par de nouveaux

arguments. Faisons donc à présent un point sur l'état des connaissances actuelles sur le sujet.

Mode de répllication asynchrone

Avancé pour la première fois en 1972 (Robberson and Clayton, 1972) par David Clayton, ce premier modèle repose sur le postulat que la répllication des 2 brins (L et H) s'effectue de manière asymétrique, asynchrone et unidirectionnelle. En d'autres termes, on considère la présence de 2 origines de répllication distinctes d'où va être initiée la répllication de chacun des brins et ce de manière décalée. Nommées O_H (pour le brin H) et O_L (pour le brin L), ces 2 origines sont distantes de 11 kb.

C'est à partir de l'origine O_H que la répllication du brin H va être initiée à l'aide d'une amorce ARN synthétisée par l'ARN polymérase MTRPOL. Nous reviendrons un peu plus tard sur cet aspect lors du **chapitre I-6.3** portant sur la transcription. Avant de poursuivre son cheminement, la fourche de répllication va s'arrêter au niveau d'une séquence conservée de 15 pb appelée séquence TAS (Termination-Associated Sequence), où une structure nommée boucle D va être générée. Dans l'ADNmt humain, cette structure est une région triple brin d'environ 650 pb dont la fonction serait de réguler le trafic de la répllication, ou de permettre le recrutement des protéines impliquées dans la formation et la ségrégation des nucléoides (Madsen et al., 1993). Après cette petite halte, la répllication va reprendre son cours jusqu'à avoir parcouru les 2 tiers du génome. Arrivée à ce niveau, le réplisome va alors mettre à nu la seconde origine O_L . En devenant simple brin après le passage de l'hélicase Twinkle, l'origine O_L va voir se former à sa position une structure en tige-boucle, qui empêche la fixation des mtSSB et assure l'initiation du second brin. Une nouvelle amorce ARN est alors mise en place par l'ARN polymérase MTRPOL au niveau d'une région poly-dT. Cette ARN polymérase est ensuite remplacée par l'ADN polymérase γ qui va procéder à la répllication du brin L (**Figure 13**). En considérant l'enchaînement de ces événements, on appelle alors brin précoce le brin H tandis que le brin L sera par conséquent le brin tardif. Au cours de son cheminement, la fourche de répllication va être accompagnée de mtSSB qui vont se déposer le long du brin H découvert. Notons que pour la synthèse du brin L, des sites d'initiation alternatifs ont été mis en évidence par modélisation *in silico* (Seligmann et al., 2006) et

permettraient d'initier la réplication à différentes positions situées entre la boucle D et l'origine O_L .

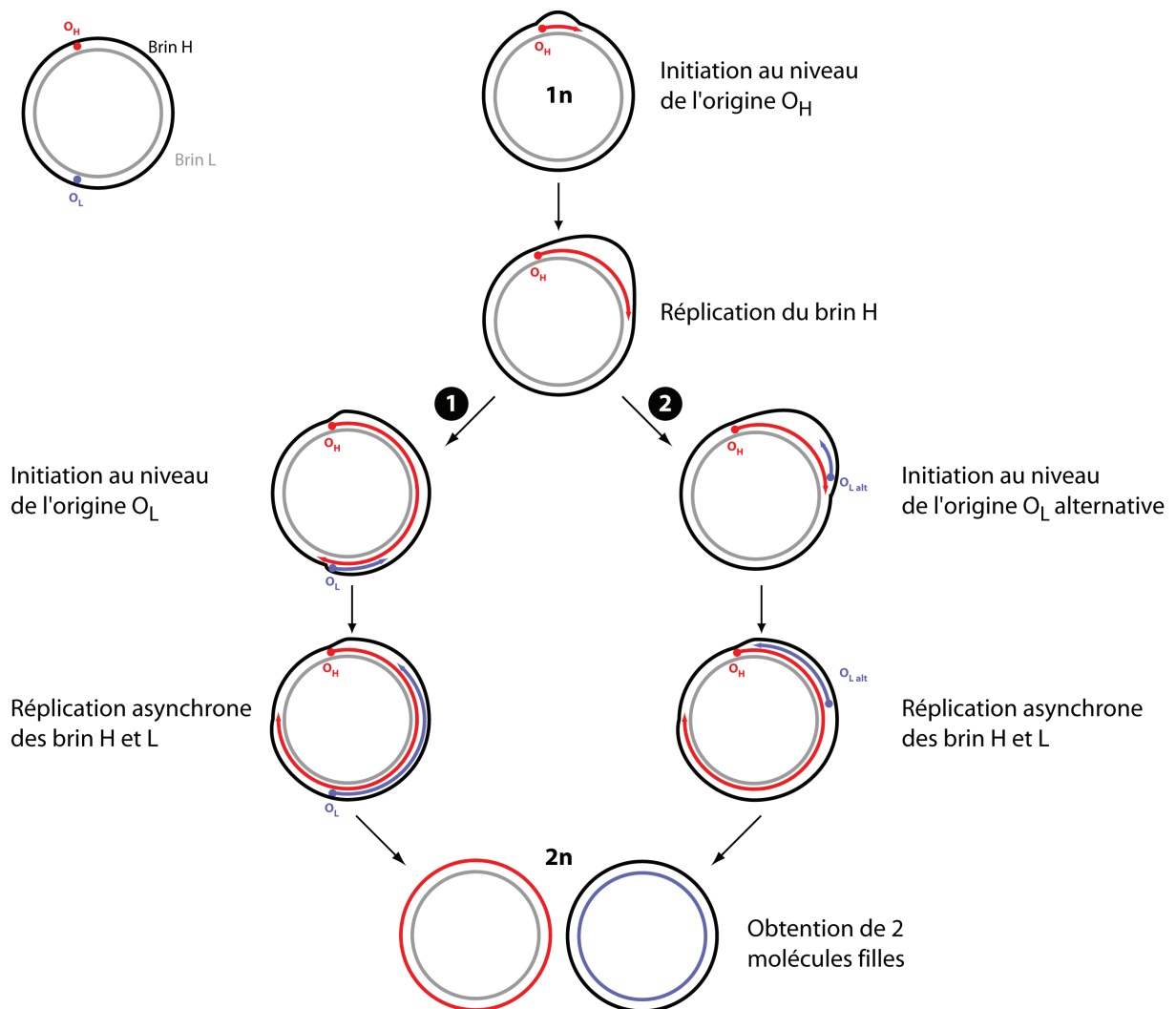


Figure 13 : Modèle de réplication asynchrone

Mode de réplication asynchrone proposé par Clayton en 1972. Ce processus est unidirectionnel, asynchrone et asymétrique. Adapté de (Wanrooij and Falkenberg, 2010)

Mode de réplication synchrone et modèle RITOLS

Face au modèle de réplication asynchrone avancé par Clayton, un autre modèle apparu au début des années 2000 propose que la réplication se ferait non pas de manière asynchrone, mais de manière simultanée et bidirectionnelle (Holt et al., 2000). Selon Ian Holt et ses collègues, la réplication serait alors initiée en de multiples sites, au niveau d'une zone nommée OriZ (**Figure 14**) couvrant le premier quart du génome et englobant les gènes du

cytochrome b et des sous-unités ND5 et ND6 (Bowmaker et al., 2003). La fourche de réplication va alors poursuivre son chemin jusqu'à atteindre l'origine O_H . Avec ce site en point de mire, il devient évident que seule la première phase de la réplication va s'effectuer de manière bidirectionnelle.

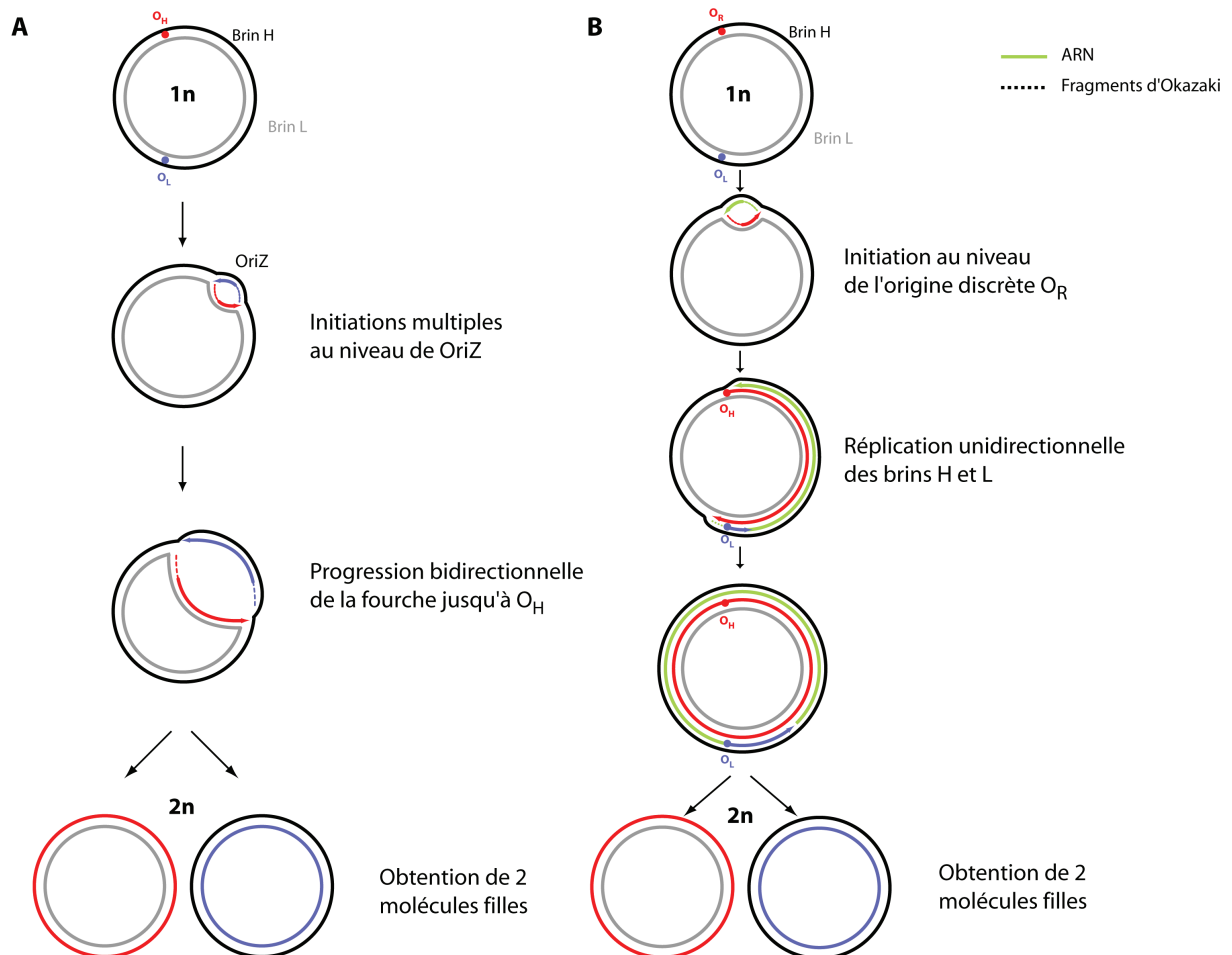


Figure 14 : Modèle de réplication synchrone et RITOLS

(A) Modèle de réplication synchrone. Dans ce modèle la réplication est initiée en de multiples sites au niveau d'une large zone nommée OriZ. La synthèse des 2 brins s'effectue de manière synchrone et bidirectionnelle. La présence de fragments d'Okazaki est représentée en pointillés. **(B)** Modèle de réplication RITOLS. Ici la réplication débute au niveau d'une origine discrète (O_R) et de manière unidirectionnelle. Elle commence au niveau du brin L avec la mise en place d'ARN (en vert) qui sera ensuite remplacé par de l'ADN (en bleu) dès que l'origine O_L sera découverte. Modifié de (Wanrooij and Falkenberg, 2010)

Pour appuyer leur modèle, Holt et Jacobs eurent recours à l'utilisation d'une méthode leur permettant de sonder l'ADNmt, pour mettre en évidence les intermédiaires structuraux présents lors de la réplication et ainsi distinguer les différents mécanismes de réplication qui s'appliquent. Cette méthode dont nous reparlerons plus en détails dans la partie **Résultats & Discussion** est l'électrophorèse bidimensionnelle d'ADNmt. Avec cette

technique, des intermédiaires de réplication partiellement double brin ont été mis en évidence. Il a tout d'abord été suggéré que ces intermédiaires étaient la preuve d'une réplication asynchrone comme montré par Clayton, mais des tests plus poussés ont permis de faire émerger une nouvelle hypothèse. En effet, il a été montré que ces intermédiaires étaient essentiellement sous forme de duplexes mais qu'ils étaient sensibles à l'action de la RNase H et contenaient également des régions hybrides ADN /ARN au niveau du brin L de l'ADNmt (Yang et al., 2002). Cette observation a donc amené l'idée que la réplication impliquait l'hybridation d'une molécule d'ARN à l'ADNmt, avant que celui-ci ne soit remplacé par de l'ADN. Cet ARN a pour rôle de protéger les parties d'ADN simple brin et remplace alors les protéines mtSSB. C'est ainsi que naquit un nouveau modèle résumé sous l'acronyme de RITOLS (Ribonucleotide Incorporation ThroughOut the Lagging Strand).

A l'heure actuelle, force est de constater qu'aucun consensus n'a pu être trouvé sur la manière dont les mitochondries répliquent leur ADN. Depuis près de 14 ans maintenant, ces 2 (si ce n'est 3) écoles de la réplication mitochondriale ont leurs partisans et leurs détracteurs, chacun d'entre eux surenchérissant avec l'apport de nouvelles preuves confortant l'une ou l'autre hypothèse. Les fidèles de Clayton brandissent les observations des réplicons obtenues par microscopie électronique tandis que sous la houlette de Holt et Jacobs, on préfère s'armer des résultats sur les intermédiaires de réplication sans cesse amenés par les gels 2D. Mais face à cela, certaines hypothèses tentent de réconcilier les 2 camps en proposant que les 2 modèles pourraient (co)exister, un changement dans le mode de réplication semblant être observé pour des cellules en culture (Pohjoismaki et al., 2006).

6.2 Réparation

Haut lieu de la production de radicaux libres de par la proximité de la chaîne respiratoire, le génome mitochondrial présente un taux de mutation 10 à 20 fois supérieur à celui de l'ADN nucléaire. De ce fait, un doute a longtemps perduré quant à l'existence de mécanismes de réparation chez les mitochondries. En effet, bien que celles-ci aient mis en place un système de surveillance et de neutralisation des ROS, complété par l'intervention d'enzymes de réparation lorsque ce système est défaillant, on s'interrogea longtemps pour savoir si elles avaient besoin de s'encombrer d'autres systèmes de

réparation. Mais aujourd'hui, le voile est levé et l'on constate que la mitochondrie s'est accaparée de nombreux processus dont le fonctionnement est comparable à ce que l'on peut trouver au niveau du noyau. Parmi cet arsenal, on trouve des mécanismes de réparation par excision de base (BER), de cassures simple (SSBR) ou double brin (DSBR), de réparation des mésappariements (MMR) ou même des mécanismes de recombinaison homologue. Petit tour d'horizon de ces différents processus, de plus amples détails étant présentés dans (Kazak et al., 2012).

Le mécanisme le mieux caractérisé et semble-t-il le plus courant au sein des mitochondries est la réparation par excision de base ou BER (Base Excision Repair). Les protéines impliquées dans ce système se situent au niveau de la membrane interne des mitochondries avec laquelle elles interagissent (Stuart et al., 2005), et ce sans pour autant entrer dans la composition du nucléoïde. Cette réparation BER est un processus durant lequel la base endommagée est excisée ainsi que le site laissé vide, avant qu'une nouvelle base ne la remplace.

Le second type de mécanisme est la réparation des cassures dans l'ADNmt, qu'elles soient simple (SSBR pour Single Strand Break Repair) ou double brin (DSBR pour Double Strand Break Repair). Moins fréquentes que les cassures simple brin qui sont plus sensibles à l'action des nucléases, agents génotoxiques ou processus d'hydrolyse spontanée, les cassures double brin entraînent des répercussions catastrophiques sur l'expression du génome. Pour se prémunir de telles altérations, le noyau s'est doté de multiples systèmes de réparation dont le mécanisme DSBR. Face à cela, on pourrait penser que ce type de mécanisme d'une importance capitale dans le noyau, serait superflu chez la mitochondrie où le génome est présent en plusieurs centaines d'exemplaires. Mais il n'en est rien, ce mécanisme étant retrouvé dans l'organite.

Le système MisMatch Repair (MMR), consiste enfin en la localisation des mésappariements et la réparation du brin néosynthétisé muté. Caractérisé il y a une dizaine d'années, ce mécanisme semble distinct du processus nucléaire, les acteurs majeurs de la réparation au cœur du noyau n'ayant pas été retrouvés dans la mitochondrie.

Bien que les mécanismes de réplication soient efficaces, il peut arriver que les dommages induits dans l'ADNmt soit irréparables. Dans ce cas, 3 options sont envisageables (**Figure 15**). Tout d'abord l'ADNmt endommagé est purement et simplement dégradé. Cette option n'est bien sûr envisageable que dans le cas de la mitochondrie, où la perte d'une des

copies du génome n'a pas de répercussions irrémédiables sur son expression. Le principal acteur de ce funeste terme est l'endonucléase G, qui est l'endonucléase la plus abondante et la plus active au sein des mitochondries (Ikeda and Ozaki, 1997). La seconde issue qui s'offre à la cellule, est la destruction de la mitochondrie qui s'engage alors dans un processus d'autophagie, ou dans le cas présent de mitophagie. Enfin, dernière solution et la plus drastique, est l'entrée en apoptose. Cette option n'est envisagée par la cellule que si le nombre de mitochondries altérées devient trop important.

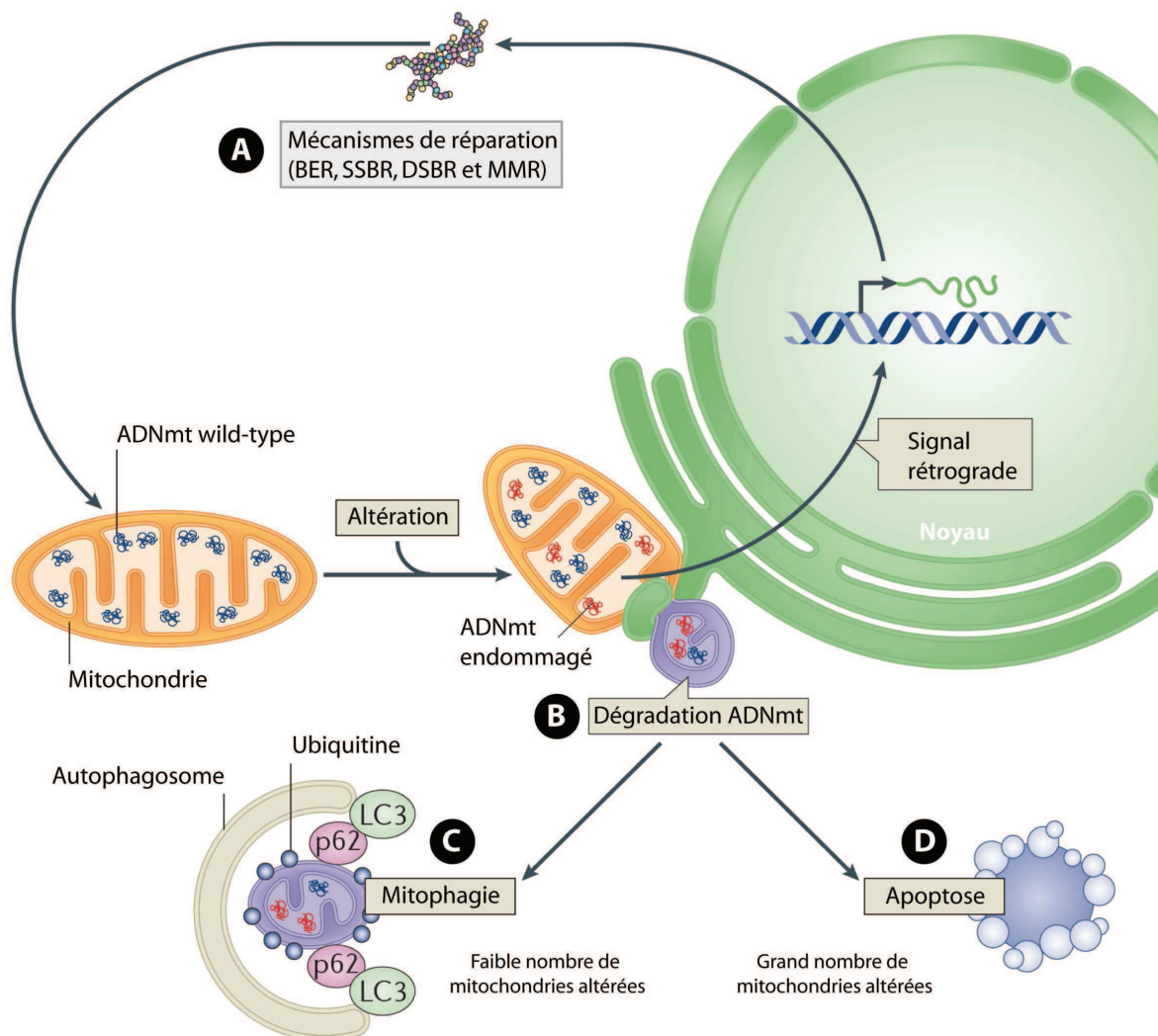


Figure 15 : Dommages mitochondriaux et maintenance de l'ADNmt

Suite à l'altération de leur ADN, les mitochondries peuvent s'engager sur différentes voies : **(A)** la réparation via des mécanismes divers, **(B)** la dégradation de l'ADNmt, **(C)** la destruction de la mitochondrie par mitophagie et enfin **(D)** l'entrée en apoptose de la cellule. Modifié de (Kazak et al., 2012)

6.3 Transcription

La transcription débute au niveau de la région non codante de l'ADN mitochondrial où chacun des brins possède son propre promoteur, LSP (Light Strand Promotor) pour le brin L et HSP (Heavy Strand Promotor) pour le brin H. L'initiation à chacun de ces sites va conduire à la formation de transcrits polycistroniques (**Figure 10**). Petite particularité, le brin H possède en fait 2 promoteurs distincts situés de part et d'autres du gène de l'ARNt^{Phe}. HSP 1, situé 16 pb en amont de ce gène va conduire à l'obtention d'un transcrit s'arrêtant au niveau de l'extrémité 3' du gène de l'ARNr 16S. L'initiation au niveau de HSP 2 est un phénomène moins fréquent et mène à la transcription de l'intégralité du brin H ([Montoya et al., 1982](#)). De l'autre coté, sur le brin L, on trouve le promoteur LSP qui est pour sa part responsable de la transcription d'un polycistron incluant 8 gènes d'ARNt ainsi que celui de la sous-unité ND6 (**Figure 16**).

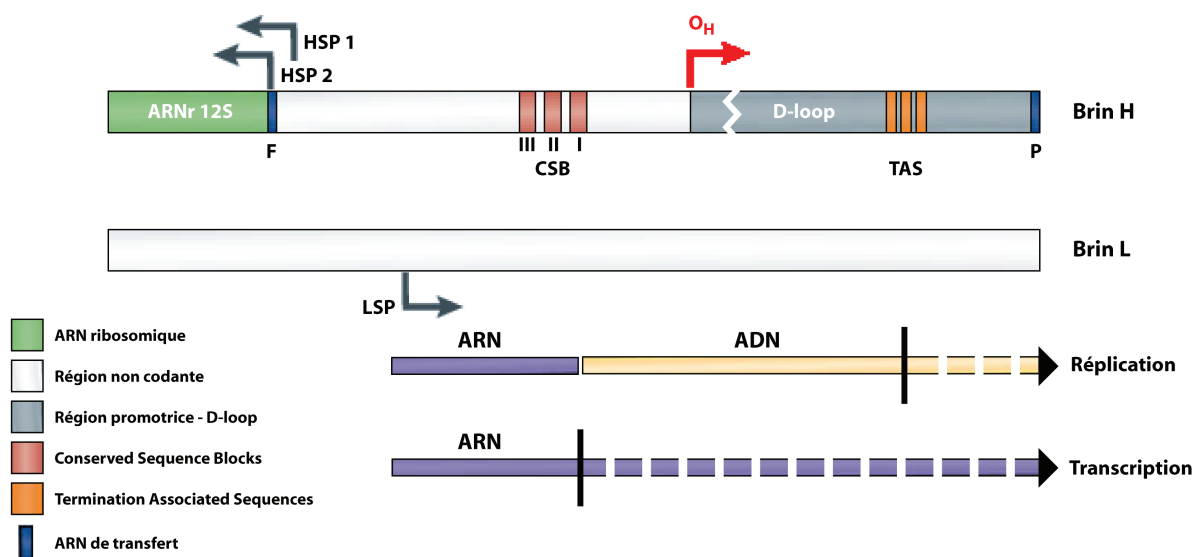


Figure 16 : Représentation schématique de la région promotrice non codante de l'ADNmt

Les promoteurs de la transcription du brin L (LSP) et du brin H (HSP 1 et HSP 2) sont représentés. La transcription initiée au niveau de LSP est interrompue au niveau de 3 blocs de séquences conservées (CSB I, II et III). A ce niveau l'ARN polymérase peut être remplacée par l'ADN polymérase γ qui va synthétiser le brin complémentaire et également faire une pause au niveau des séquences TAS où la boucle D est formée. Modifié de ([Falkenberg et al., 2007](#))

D'un point de vue général, il est intéressant de noter que la plupart des gènes de l'ADNmt ont pour voisin direct un gène d'ARNt, dont l'excision par les RNase P et Z va

permettre d'obtenir l'ARNm ou l'ARNr mature. Ce processus découvert en 1981 est désigné sous le terme de « tRNA punctuation model » (Ojala et al., 1981).

L'enzyme clé du processus de transcription est l'ARN polymérase MTRPOL. D'une masse de 120 kDa, cette enzyme possède au niveau de son extrémité C-terminale une série de motifs conservés que l'on retrouve chez la polymérase des phages T3, T7 et SP6. Sa partie N-terminale, serait quant à elle impliquée dans le maintien de la stabilité de l'enzyme et sa fixation au génome mitochondrial. Pour initier la transcription, la MTRPOL requiert la présence du facteur de transcription TFAM ainsi que TFB2M. TFAM est capable de lier l'ADN sans aucune spécificité et serait alors impliqué dans le niveau de compaction du génome (Kaufman et al., 2007). Mais paradoxalement, il est également capable de se lier avec une haute affinité en amont des promoteurs HSP et LSP. Cette spécificité serait due à une séquence située au niveau de sa queue C-terminale, qui lui permettrait de se lier de manière précise à l'ADN et de partiellement le dérouler pour en faciliter la transcription (Dairaghi et al., 1995). Capable de stimuler l'activation des promoteurs LSP et HSP, TFAM joue un rôle de premier ordre dans la régulation de la transcription (Matsushima et al., 2010; Shutt et al., 2010).

Autre facteur d'importance mais impliqué dans l'arrêt de la transcription, le facteur mTERF joue un rôle dans la régulation de la transcription en intervenant au niveau de la sélection du site d'initiation (Fernandez-Silva et al., 2003) ainsi que dans la formation de la boucle D (Martin et al., 2005). Cette protéine de 342 acides aminés a pour fonction d'arrêter la progression de l'ARN polymérase MTRPOL en se fixant avec une haute affinité au niveau du gène de l'ARNt^{Leu} et ainsi de réguler le taux d'ARNr 12S et 16S. Mais son rôle ne se limite pas à cela, mTERF joue également les garde-fous et coordonne la transition réplication/transcription assurant ainsi l'expression du génome (Hyvarinen et al., 2007).

Intimement liée à la réplication de l'ADNmt, la transcription assure la formation d'une amorce nécessaire pour initier la réplication (**Figure 16**). C'est la MTRPOL qui assure cette fonction et génère l'amorce ARN utilisée pour initier la réplication du brin H au niveau de l'origine O_H. Profitons de l'explication de ce mécanisme pour revenir le temps de quelques lignes à la réplication. Ce primer d'une centaine de nucléotides est formé suite à l'initiation de la transcription du promoteur LSP et sa synthèse est interrompue 5 à 10 nucléotides en aval d'un élément de séquence conservé, noté CSB II (Conserved Sequence

Block). C'est à ce niveau, que l'ADN polymérase γ entre en scène et synthétise l'ADN jusqu'à atteindre, nous l'avons vu, une séquence conservée de 15 pb appelée séquence TAS (Termination-Associated Sequence) où la boucle D (D-loop) va être formée. Notons que cet arrêt prématuré de la transcription n'est pas récurrent et que dans environ 40% des cas, la transcription se poursuit normalement (Kang et al., 1997).

Hormis la polymérase MTRPOL, la réplication est également sous le joug du facteur TFAM. Il a été montré que ce facteur semble induire un changement dans le mode de réplication de cellules en culture (Pohjoismaki et al., 2006), celui-ci passant alors d'un mode RITOLS à un mode synchrone. Ces différents témoignages font donc de TFAM un facteur essentiel à la régulation du génome mitochondrial.

6.4 Traduction

Pour refermer ce triptyque du dogme génétique chez la mitochondrie, disons quelques mots sur la traduction mitochondriale qui recèle encore de nombreux mystères. La plupart des protéines mitochondriales étant encodées au sein du génome nucléaire, leur traduction incombe alors aux ribosomes cytosoliques. Mais comme nous l'avons vu, certaines de ces protéines échappent à la règle et doivent alors être traduites au sein de la mitochondrie où elles seront intégrées au sein de la chaîne respiratoire. Ces protéines sont au nombre de 13, 7 d'entre elles codant pour le complexe I, 1 pour le complexe III, 3 pour le complexe IV et 2 pour le complexe V. Malgré des années de recherche, les connaissances sur ce processus restent minces, et aucun système de traduction *in vitro* capable de reproduire les conditions mitochondriales n'a pu être développé.

L'acteur principal de ce mécanisme est un ribosome 55S d'une masse molaire de 2700 kDa. Il intègre les 2 seuls ARNr encodés par le génome nucléaire : l'ARNr 12S (pour la petite sous-unité 28S) et l'ARNr 16S (pour la grande sous-unité 39S) (Koc et al., 2001) ainsi que l'ARNr 5S dont les nombreuses fonctions ne sont pas toutes élucidées (Sharma et al., 2003) et dont nous parlons plus en détails dans l'**Article n°1**. Hormis le ribosome, la mitochondrie possède un pool de 22 ARNt, tous encodés par l'ADNmt chez l'Homme, un pour chaque acide aminé exception faite de la leucine et de la sérine qui en ont 2 exemplaires. Ces ARNt ont des particularités structurales qui les distinguent des ARNt

Essentiel à la synthèse des 13 protéines mitochondriales, le mécanisme de traduction ne peut tolérer de dysfonctionnements. En effet, la moindre altération aura des répercussions sur l'ensemble de ces protéines et conduira à l'émergence de maladies mitochondriales.

II. Maladies mitochondriales

Caractérisées par un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire, les maladies mitochondriales regroupent une pléiade d'affections qui peuvent être définies et classifiées sur la base d'examen cliniques, de critères morphologiques ou biochimiques. Cette classification dont les fondements ont été mis en place en 1985 (DiMauro et al., 1985) s'appuie sur des défauts ayant lieu lors d'une des 5 étapes clés du métabolisme mitochondrial, à savoir : le transport du substrat, l'utilisation de ce substrat, le cycle de Krebs, le transport des électrons et enfin le couplage oxydation/phosphorylation. Toujours en vigueur cette classification a depuis été largement enrichie de nouvelles catégories.

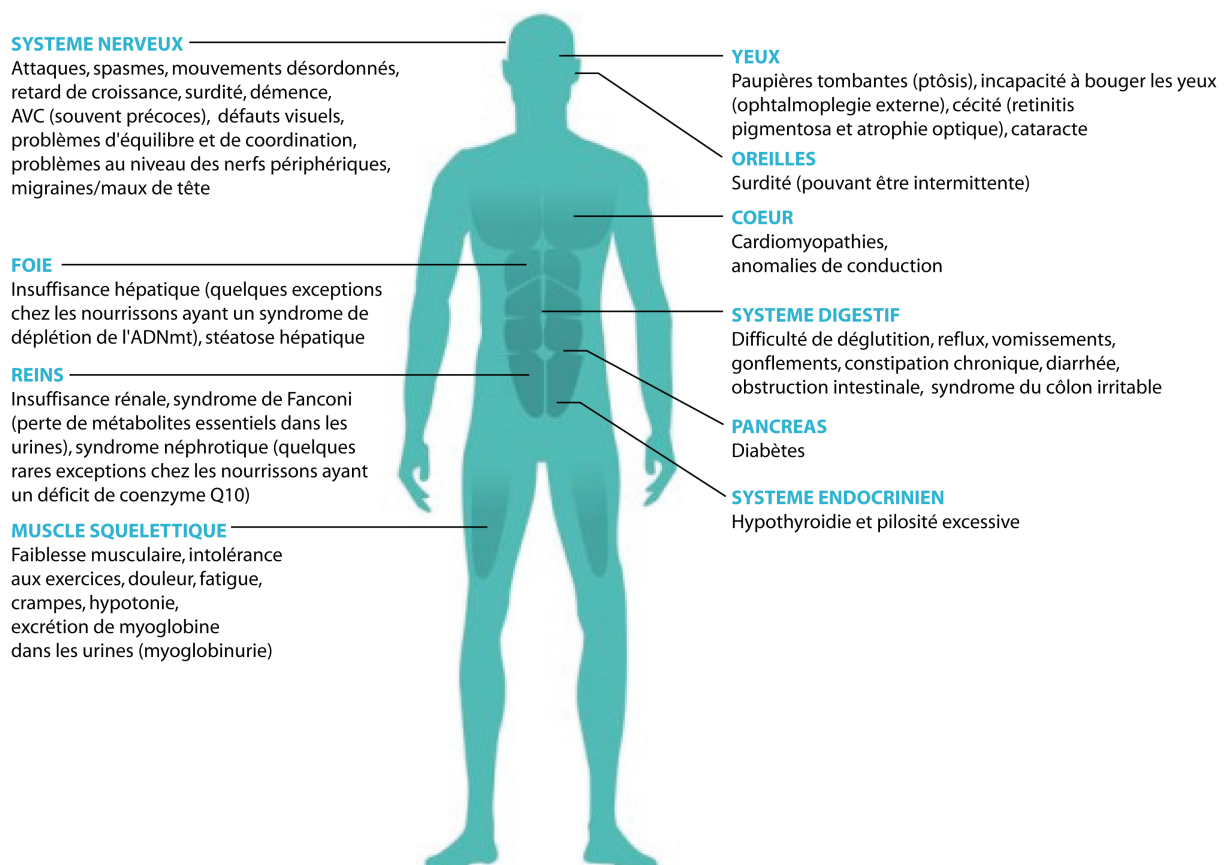


Figure 18 : Tableau clinique des maladies mitochondriales

Les organes les plus affectés par les maladies mitochondriales sont les muscles et autres organes les plus demandeurs en énergie. Le tableau des symptômes présentés ici est non exhaustif.

A l'origine, c'est en 1962 que le concept de maladie mitochondriale a été introduit pour la première fois (Luft et al., 1962), suivi 2 ans plus tard par la notion de myopathie lorsque les cliniciens concentrèrent leur attention sur les défauts musculaires associés (Shy and Gonatas, 1964). En effet, les premières proies de ces maladies sont les muscles et les organes les plus demandeurs en énergie tels que le cœur, le cerveau, les reins, le foie, le système nerveux central et le système endocrinien. Nombreux sont les symptômes associés à l'apparition de ces maladies essentiellement neuromusculaires (**Figure 18**).

A l'origine de ces maladies se trouvent des mutations dans l'ADN, mais la double dépendance génétique de la mitochondrie la rend sensible à des altérations affectant non seulement le génome mitochondrial mais également l'ADN nucléaire. La transmission de ces maladies s'effectue de 2 manières. Elle peut tout d'abord se faire via un mode classique suivant la génétique mendélienne pour l'ADN nucléaire. Dans ce cas, la transmission est dite autosomique dominante ou récessive, ou bien encore liée à l'X. La transmission d'une mutation affectant le génome mitochondrial obéit pour sa part à d'autres règles, l'ADNmt se transmet alors selon un mode dit maternel où seul l'ADNmt de la mère est conservé lors de la fécondation, les mitochondries des spermatozoïdes ne participant pas à la formation de l'œuf car détruites par ubiquitinylation (Sutovsky et al., 1999).

1. Maladies associées à une mutation dans l'ADN mitochondrial

1.1 Caractéristiques mitochondriales

Depuis 1988, plus de 270 mutations ont été recensées et que ce soit des mutations ponctuelles, des délétions, des duplications ou des inversions, ces anomalies n'épargnant aucun gène (**Tableau 1**).

Plus de la moitié d'entre elles sont des mutations ponctuelles localisées au niveau des gènes des ARNt alors que ceux-ci ne représentent que 10% du génome. Proportionnellement, les mutations affectant les gènes codant pour les protéines de la chaîne respiratoire qui couvrent 70% du génome ne comptent que pour 40% des mutations. Les 2% de mutations restants affectent les 2 gènes des ARN ribosomiques, soit 15% de la capacité codante de l'ADNmt. Cette disparité dans la distribution suggérerait l'existence d'un mécanisme de surveillance lors de l'embryogenèse, qui serait moins strict envers des

mutations affectant les ARNt que pour des protéines essentielles de la chaîne respiratoire. Cependant, l'hypothèse inverse est également envisageable, des mutations au niveau des gènes des ARNt et ARNr ayant un impact délétère plus global sur la traduction. Le faible nombre de mutations au niveau des gènes des ARNr irait alors dans ce sens, seules quelques mutations ayant été répertoriées au niveau de ces éléments essentiels à la synthèse protéique (Schon et al., 2012).

Produit du gène	Nombre de mutations	Principale affection
ARN ribosomique		
ARNr 12S	5	Surdité
ARNr 16S	1	MELAS atypique
ARN de transfert		
ARNt ^{Ala}	3	Myopathie
ARNt ^{Arg}	2	Divers
ARNt ^{Asn}	5	Myopathie
ARNt ^{Asp}	2	Divers
ARNt ^{Cys}	3	Divers
ARNt ^{Gln}	3	Divers
ARNt ^{Glu}	7	Défaut réversible chaîne resp.
ARNt ^{Gly}	3	Divers
ARNt ^{His}	4	Divers
ARNt ^{Ile}	14	Ophthalmoplégie
ARNt ^{Leu (CUN)}	8	Myopathie
ARNt ^{Leu (UUR)}	23	MELAS
ARNt ^{Lys}	14	MERRF
ARNt ^{Met}	2	Divers
ARNt ^{Phe}	14	Myopathie
ARNt ^{Pro}	5	Multisystémique
ARNt ^{Ser (AGY)}	4	Myopathie
ARNt ^{Ser (UCN)}	12	Myopathie ; Surdité
ARNt ^{Thr}	2	Divers
ARNt ^{Trp}	12	Encéphalomyopathie
ARNt ^{Tyr}	4	Myopathie
ARNt ^{Val}	6	Multisystémique
Protéines		
ATP synthase 6	13	NARP / MILS
ATP synthase 8	2	Divers
COX I	10	Divers
COX II	8	Divers
COX III	6	Myopathie
Cytochrome b	21	Myopathie sporadique
ND1	16	MELAS ; LHON
ND2	3	Divers
ND3	5	Syndrome de Leigh
ND4	5	LHON
ND4L	1	LHON
ND5	12	MELAS
ND6	13	LHON

Tableau 1 : Mutations dans l'ADNmt et pathologies associées

Tous les gènes de l'ADNmt peuvent être affectés par des mutations. Le plus touché est celui de l'ARNt^{Leu} qui est associé à pas moins de 23 mutations. Adapté de (Schon et al., 2012)

Mais l'apparition de ces mutations et la variabilité dans leur niveau de sévérité peut s'expliquer par l'existence de mécanismes propres aux mitochondries : l'hétéroplasmie, la ségrégation mitotique, l'expansion clonale ou encore par la théorie du goulot d'étranglement.

L'hétéroplasmie peut se définir simplement comme la coexistence, au sein d'une même mitochondrie, du génome mitochondrial sous sa forme saine et mutée (**Figure 19**). Rappelons que le génome mitochondrial est présent en plusieurs exemplaires, son nombre variant entre 100 et 1 000 copies par mitochondrie. L'apparition ainsi que la sévérité des symptômes va alors être fonction de la proportion de chacune de ces formes. On considère ainsi une valeur seuil au-delà de laquelle les dysfonctionnements de la chaîne respiratoire vont apparaître. Cette valeur est généralement fixée aux environs de 65%, mais celle-ci n'est pas un paramètre défini, car elle peut varier en fonction du tissu considéré, de l'âge du patient ou du type de mutation. En effet, on estime à 90% le taux d'hétéroplasmie moyen pour une mutation affectant un ARNt, celui-ci redescendant à 75% pour une large délétion. Mais au-delà de 95%, peu importe le type de mutation, l'effet causé sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire est dévastateur.

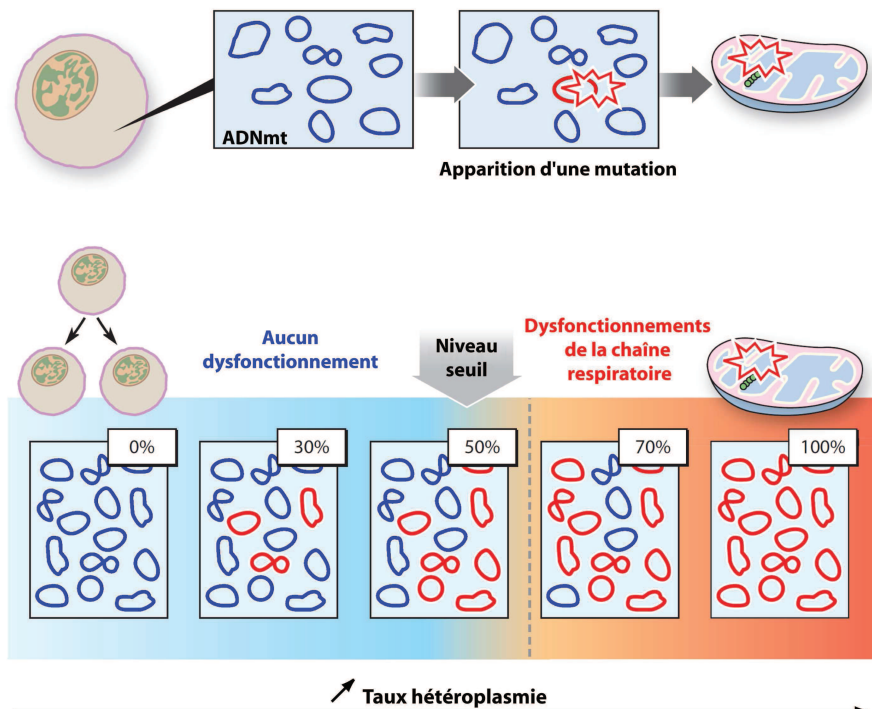


Figure 19 : Principe de l'hétéroplasmie

L'ADNmt est présent en plusieurs centaines d'exemplaires au sein des mitochondries. Si une mutation apparaît, l'ADNmt sain (bleu) et muté (rouge) peuvent coexister sans induire de dysfonctionnement, mais ce jusqu'à un certain seuil. Au-delà, il y a apparition de dysfonctionnements de la chaîne respiratoire. Adapté de (Larsson, 2010)

Autre phénomène participant à l'autonomie génétique des mitochondries et à sa potentielle dérive, la ségrégation mitotique s'effectue durant la mitose et introduit un biais dans la répartition des génomes mitochondriaux. Ainsi, lorsque les mitochondries et par extension leur contenu génétique sont partagées de manière aléatoire entre les cellules filles, nous pouvons assister à la genèse de populations dont le contenu génétique diffère. Cette disparité basée sur l'existence préalable d'une hétéroplasmie au sein de la mitochondrie, peut être à double tranchant, conduisant soit à la dilution du génome muté et à terme à sa disparition, soit au contraire à l'émergence de mutations.

Mais le hasard ne fait pas tout et un autre biais existe dans l'expression des mitochondries, à savoir qu'une version du génome peut être amplifiée de manière spécifique. Derrière ce phénomène se cache un mécanisme d'expansion clonale qui semble être une dérive génétique aléatoire due à une réplication de l'ADNmt non contrôlée.

Enfin, on peut également considérer l'existence d'un mécanisme de sélection qui aurait lieu au cours du développement embryonnaire. En effet, il n'est pas rare de constater au sein d'une même famille, l'atténuation voire la disparition totale d'une mutation avec un retour à un état homoplasmique. Les mécanismes qui président à la mise en place de ce goulot d'étranglement génétique sont toujours inconnus, mais selon différentes hypothèses, cette disparité pourrait s'accompagner ou non d'une diminution du nombre de copies de l'ADNmt ou d'une amplification préférentielle de la version saine du génome (Cao et al., 2007; Cree et al., 2008). Il est également envisagé que ce mécanisme n'aurait pas lieu durant l'embryogenèse mais bien avant, durant le processus folliculogénèse (Wai et al., 2008), mais pour clarifier la situation de plus amples recherches doivent être menées.

En résumé, c'est l'action combinée de ces différents mécanismes qui sous-tend l'émergence et l'expression d'une mutation et en définitive la sévérité.

1.2 Mutations ponctuelles

Représentant plus de la moitié des mutations, les mutations ponctuelles affectent le plus souvent le fonctionnement des ARNt, ce qui va avoir des retombées au niveau de la synthèse protéique en général et impacte l'ensemble des protéines de la chaîne respiratoire. Ces mutations émergent ainsi au niveau de positions critiques pour la stabilité de la

résidu soit également impliqué dans la reconnaissance de l'ARNt par la synthétase (Sohm et al., 2004). Cette mutation A3243G est associée à différents syndromes dont le plus courant est le syndrome MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes), syndrome multisystémique léthal dès l'enfance dans lequel cerveau, muscles et système endocrinien sont altérés. D'un point de vue moléculaire, cette affection se caractérise par une diminution du niveau d'aminoylation et un problème de reconnaissance du codon UUG, ce qui conduit à un dysfonctionnement du complexe I (ou IV) (Koga et al., 2010) et affecte le niveau de respiration. Cette mutation A3243G est certes la mutation la plus courante (80% des cas) mais ce syndrome est retrouvé dans plus d'une douzaine de mutations. En effet, un syndrome donné peut être induit par diverses mutations mais la réciproque est vraie, à savoir qu'une même mutation peut conduire à l'émergence de syndromes distincts. Les mécanismes qui gouvernent le lien de causalité entre une mutation et le (ou les) syndrome(s) qui lui sont associés restent encore méconnus.

1.3 Délétions et réarrangements de l'ADN mitochondrial

Découverts en 1988 (Lestienne and Ponsot, 1988), les réarrangements qui se produisent au sein de l'ADNmt conduisent à la perte de plusieurs milliers de bases (entre 2 et 10 kb) (Schon et al., 1989) et des gènes qui leur sont associés. La manière dont sont générées ces altérations reste encore obscure, bien qu'il semble qu'elles soient consécutives à un problème de mésappariement des brins lors de la réplication ou encore à une erreur lors de la réparation de cassures double-brin (Krishnan et al., 2008). Cette hypothèse est appuyée par l'existence de régions répétées de 5 à 13 pb (Damas et al., 2012) présentes de part et d'autre de la région amputée. Ce type de réarrangement est de nature sporadique et bien qu'il varie d'un patient à l'autre, on constate une homogénéité dans le type de délétion chez un patient donné. La délétion se produit de manière aléatoire au sein d'une molécule d'ADNmt et est ensuite amplifiée de manière exponentielle via le mécanisme d'expansion clonale. Cette observation suggère que la délétion tend à se produire chez la mère ou alors durant l'embryogenèse. Bien que ces mutations semblent pouvoir survenir n'importe où dans le génome, elles apparaissent le plus souvent entre les 2 origines de réplication (**Figure 21**) et sont associées à l'émergence de 3 pathologies dont les effets sont similaires mais à des degrés variés (DiMauro and Schon, 2003).

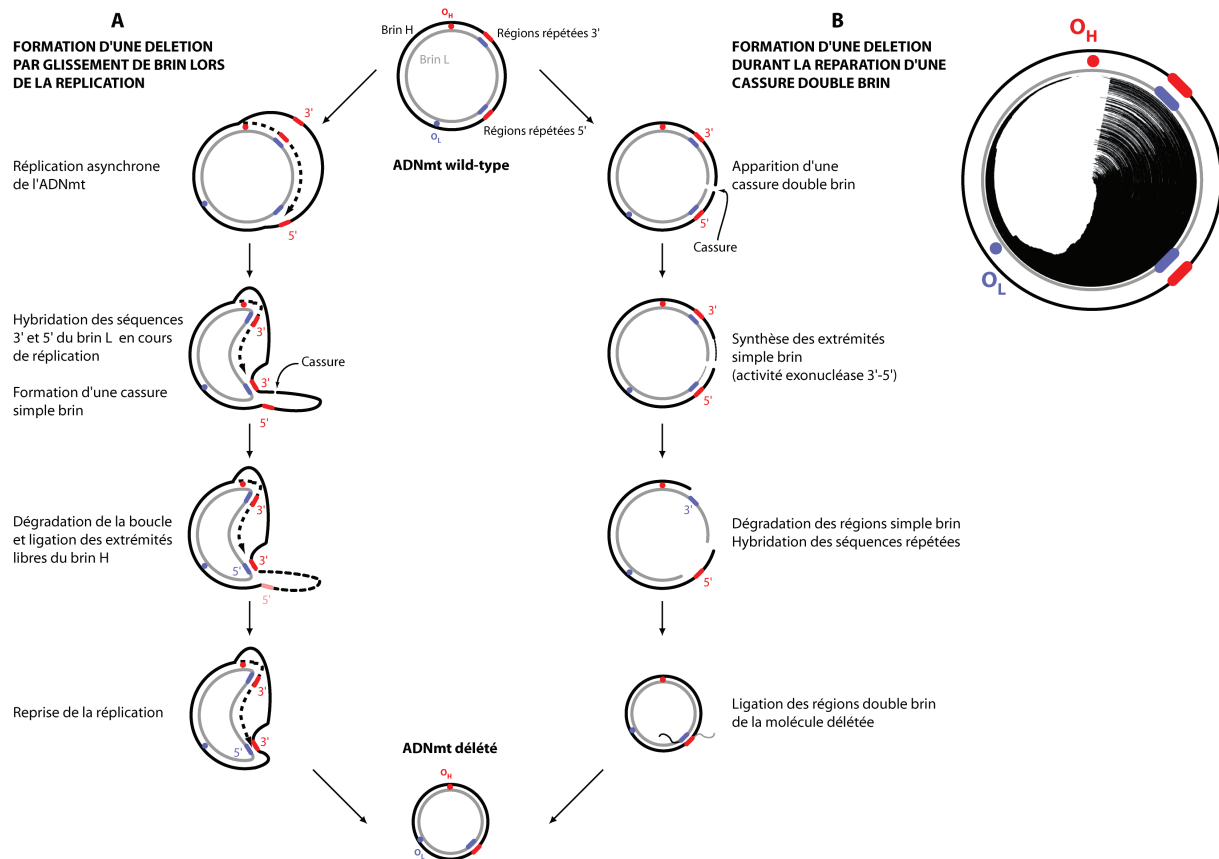


Figure 21 : Mécanismes de formation d'une délétion

Schéma explicatif de la formation d'une délétion **(A)** par glissement de brin lors de la réplication et **(B)** lors de la réparation d'une cassure double brin. Les 2 mécanismes font intervenir des séquences répétées présentes sur le brin H (rouge) et L (bleu). Comme représenté schématiquement en haut à droite, les délétions surviennent le plus généralement entre les 2 origines de réplication. Modifié de (Krishnan et al., 2008)

Ces 3 syndromes sont l'ophtalmoplégie externe progressive chronique (CPEO), le syndrome de Pearson et le syndrome de Kearns-Sayre (KSS). Tous trois se caractérisent par une ophtalmoplégie progressive, c'est-à-dire une atteinte des muscles externes de l'œil empêchant ses mouvements latéraux et l'apparition d'un ptôsis (un affaissement de la paupière supérieure). Dans chacune de ces affections, au moins un gène d'ARNt est supprimé, ce qui compromet la traduction des 13 protéines de la chaîne respiratoire et ce, même pour des cellules hétéroplasmiques. Mais dans ce cas, il faut atteindre un niveau d'hétéroplasmie d'au moins 80% pour que le nombre de copies d'ADNmt sauvages restantes soient dans l'impossibilité de compenser cette perte (Gilkerson et al., 2008). Il semble donc que ce soit le taux d'hétéroplasmie et la distribution des délétions qui soient le facteur déterminant dans l'émergence de symptômes cliniques et non la taille et la localisation de la délétion.

2. Maladies associées à une mutation dans l'ADN nucléaire

Lorsque l'on parle de maladie mitochondriale, on aurait tendance à s'arrêter au sens strict du terme et à en oublier que la mitochondrie est également sous l'autorité d'un autre génome, le génome nucléaire. De ce fait, toute altération d'un des gènes de l'ADNn encodant une protéine indispensable pour la chaîne respiratoire ou d'autres fonctions mitochondriales aura également de sévères répercussions sur leur fonctionnement. Environ 150 mutations altèrent indirectement les mécanismes mitochondriaux.

Une maladie liée à une mutation dans l'ADN nucléaire (ADNn) peut voir 3 grandes catégories de gènes impliquées : les gènes structuraux, les gènes encodant des facteurs d'assemblage et enfin les gènes contrôlant la maintenance de l'ADNmt. L'existence de mutations au sein de gènes dirigeant l'expression de protéines impliquées dans la maintenance ou l'expression du génome est à double tiroir. En effet, la mutation qui a pu apparaître au sein de l'ADNn va se répercuter sur le génome mitochondrial et induire une instabilité se manifestant par l'apparition de multiples mutations ponctuelles, délétions ou même conduire à la déplétion, c'est-à-dire la disparition du génome mitochondrial.

2.1 Mutations des gènes structuraux de la chaîne respiratoire

Le plus sûr moyen de voir apparaître une pathologie, est qu'une mutation affecte directement l'un des gènes encodant une des sous-unités de la chaîne respiratoire et en perturbe l'intégrité structurale. L'une des principales affections liées à une telle défaillance est le syndrome de Leigh ([Leigh, 1951](#)). Même si dans l'absolu cette affection peut être d'origine mitochondriale, il faut noter que la plupart des gènes atteints sont codés par le génome nucléaire (**Tableau 2**). Cette affection est due un défaut dans les sous-unités structurales de la chaîne respiratoire (ou le cas échéant des facteurs assurant son assemblage) et se caractérise par une neurodégénérescence émergeant dès l'enfance mais dont le mécanisme reste encore obscur.

Un autre exemple, est l'atteinte de l'expression du coenzyme Q10 conduit à l'apparition de 3 syndromes majeurs dont les différences d'expression (myoglobulinurie, encéphalopathie, atrophie cérébrale...) sont le reflet de mutations affectant différentes enzymes.

Polypeptides	Complexe I	Complexe II	Complexe III	Complexe IV	Complexe V
Sous-unités codées par l'ADNmt	7	0	1	3	2
Sous-unités codées par l'ADNn	~39	4	10	10	~14
Facteurs d'assemblage	~11	~2	~9	~30	~3

Tableau 2 : Sous-unités et facteurs d'assemblage de la chaîne respiratoire

Les sous-unités de la chaîne respiratoire ont une double origine génétique. Elles sont soit codées par l'ADNmt, soit par l'ADNn. Le nombre de ces sous-unités ainsi que des facteurs permettant leur assemblage sont donnés pour chaque complexe respiratoire. (Schon et al., 2012)

2.2 Mutations des gènes des facteurs d'assemblage

Ce second type de mutations pourrait être qualifié d'indirect, car ce n'est pas un gène d'une des sous-unités respiratoire qui est muté, mais l'un des gènes impliqués dans l'assemblage de ces complexes. Pour illustrer ce type d'affection par procuration, nous pouvons prendre l'exemple des sous-unités COX impliquées dans la formation du complexe IV. Des cas de mutations dans des protéines auxiliaires (ex. : SURF1, SCO1, SCO2...) ont été rapportés comme induisant l'apparition d'un syndrome de type Leigh ou d'autres affections multisystémiques (Sacconi et al., 2003; Zhu et al., 1998). Toujours associée au même type de syndrome, une mutation au niveau du facteur BCS1L assurant l'assemblage du complexe III a également été reportée (de Lonlay et al., 2001). La protéine d'assemblage ATP12 associée au complexe V, est quant à elle responsable de maladies multisystémiques infantile lorsqu'elle est mutée. Le cerveau, le foie, le cœur et les muscles étant en sont alors affectés (De Meirleir et al., 2004). Additionnées, les mutations ayant lieu au niveau des gènes codant pour les sous-unités de la chaîne respiratoire et des facteurs permettant leur assemblage sont souvent reliées à l'apparition précoce de maladies rares dont les symptômes sont dévastateurs.

2.3 Mutations des gènes des facteurs contrôlant la maintenance de l'ADNmt

Dernière catégorie de gènes qui lorsqu'ils sont mutés sont liés à l'apparition de maladies mitochondriales, les gènes des facteurs qui contrôlent l'expression et la maintenance de l'ADNmt constituent également la cible de multiples mutations (**Figure 22**).

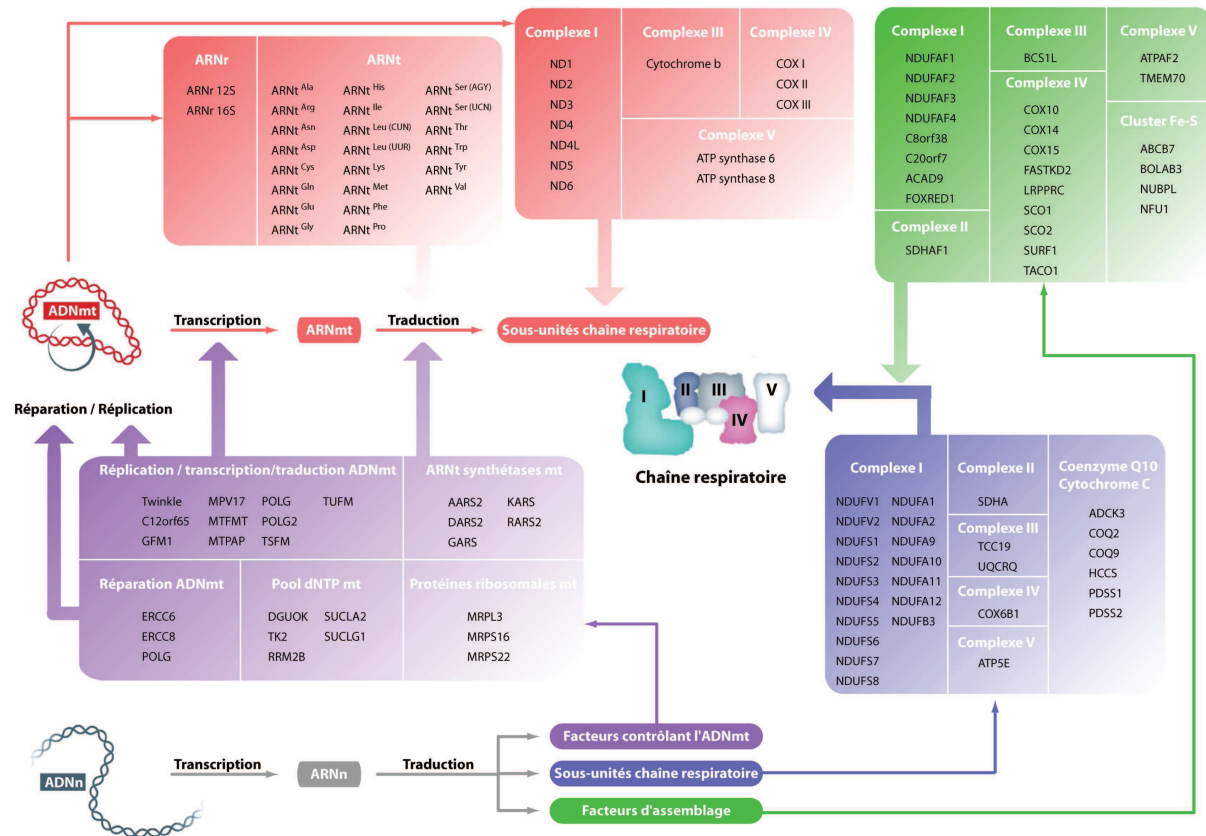


Figure 22 : Gènes mitochondriaux et nucléaires affectés par une mutation

Les maladies mitochondriales peuvent affecter les gènes mitochondriaux ou nucléaires. L'ADNmt ne code que pour des protéines de la chaîne respiratoire ou des facteurs impliqués dans leur synthèse (rouge). L'ADNn encode les facteurs contrôlant l'ADNmt (violet), des sous-unités de la chaîne respiratoire (bleu) et les facteurs permettant leur assemblage au sein des complexes (vert). Adapté de (Koopman et al., 2013)

Pour illustrer ce groupe de gènes, prenons le cas du gène codant la fameuse polymérase γ . Près de 150 mutations ont été répertoriées au sein de ce gène, entraînant un défaut de la réplication de l'ADNmt et l'émergence de multiples affections. On peut citer pêle-mêle épilepsie, ataxie, ophtalmoplégie ou syndrome d'Alpers qui est une encéphalopathie caractérisée par la triade de signes cliniques suivante : régression psychomotrice, crises d'épilepsie, et maladie hépatique. Second membre du réplisome, l'hélicase Twinkle va par son dysfonctionnement introduire de multiples délétions de l'ADNmt (Tynismaa et al., 2005). La majorité des mutations affectent l'hélicase au niveau de la région charnière entre le domaine hélicase de l'extrémité C terminale et l'extrémité N terminale, et sont associées avec un syndrome adPEO qui est une mutation autosomique dominante liée à l'apparition d'ophtalmoplégies (Zeviani et al., 1989).

3. Modèles d'études des maladies mitochondriales

Un des principaux obstacles dans l'étude des maladies mitochondriales, est le manque de modèles animaux dont les caractéristiques moléculaires et biochimiques correspondent à la mutation étudiée.

3.1 Cellules cybrides

A l'heure actuelle, aucune technologie ne permet d'introduire de manière stable et pérenne de l'ADN au sein d'une mitochondrie de mammifère. Cette barrière technologique complique sérieusement l'étude des mutations de l'ADNmt et la compréhension des maladies mitochondriales. Pour étudier la pathogénicité de telles affections, il a donc fallu développer un modèle adapté. C'est en 1989 qu'une ingénieuse approche a permis de créer le modèle le plus utilisé dans l'étude des maladies mitochondriales, les cellules cybrides (King and Attardi, 1989). Ces cellules résultent de la fusion de cytoplastes énucléés de patient porteurs d'une mutation dans l'ADNmt et de cellules immortalisées débarrassées de leurs mitochondries. En pratique, les cellules immortalisées déficientes en thymidine kinase sont soumises à un traitement au bromure d'éthidium qui est un inhibiteur de la réplication mitochondriale. Après fusion, les cellules sont sélectionnées par étalement sur un milieu dépourvu d'uridine ou de pyruvate et riche en bromodéoxyuridine. Seules les cellules ρ^0 ayant fusionnées avec les cytoplastes peuvent pousser sur un tel milieu (Figure 23).

En fournissant un environnement d'étude contrôlé, les cellules cybrides permettent l'étude des conséquences fonctionnelles et physiologiques de la variation du taux d'hétéroplasmie. Mais même si ces cellules semblent être l'outil idéal, certaines précautions doivent être prises car certaines dissemblances peuvent apparaître entre le génotype et le phénotype affichés par les cellules. En effet, dans le cas de l'utilisation de cellules aneuploïdes, une différence dans la proportion des génomes nucléaires et mitochondriaux peut exister et alors affecter la stœchiométrie des sous-unités de la chaîne respiratoire. De même, des cellules tumorales nécessitent de fortes demandes énergétiques qu'elles vont puiser au niveau de la glycolyse et ce au détriment de la chaîne respiratoire, ce qui impactera l'expression phénotypique de la mutation (Swerdlow, 2007). Enfin, le

transcriptome des cybrides peut également être bouleversé lors de leur création, les processus mis en oeuvre ayant tendance à induire une surexpression des transcrits.

L'ensemble de ces mécanismes explique donc la différence constatée dans certains cas, comme par exemple pour de larges délétions de l'ADNmt où l'effet sur certaines fonctions physiologiques n'est que mesuré.

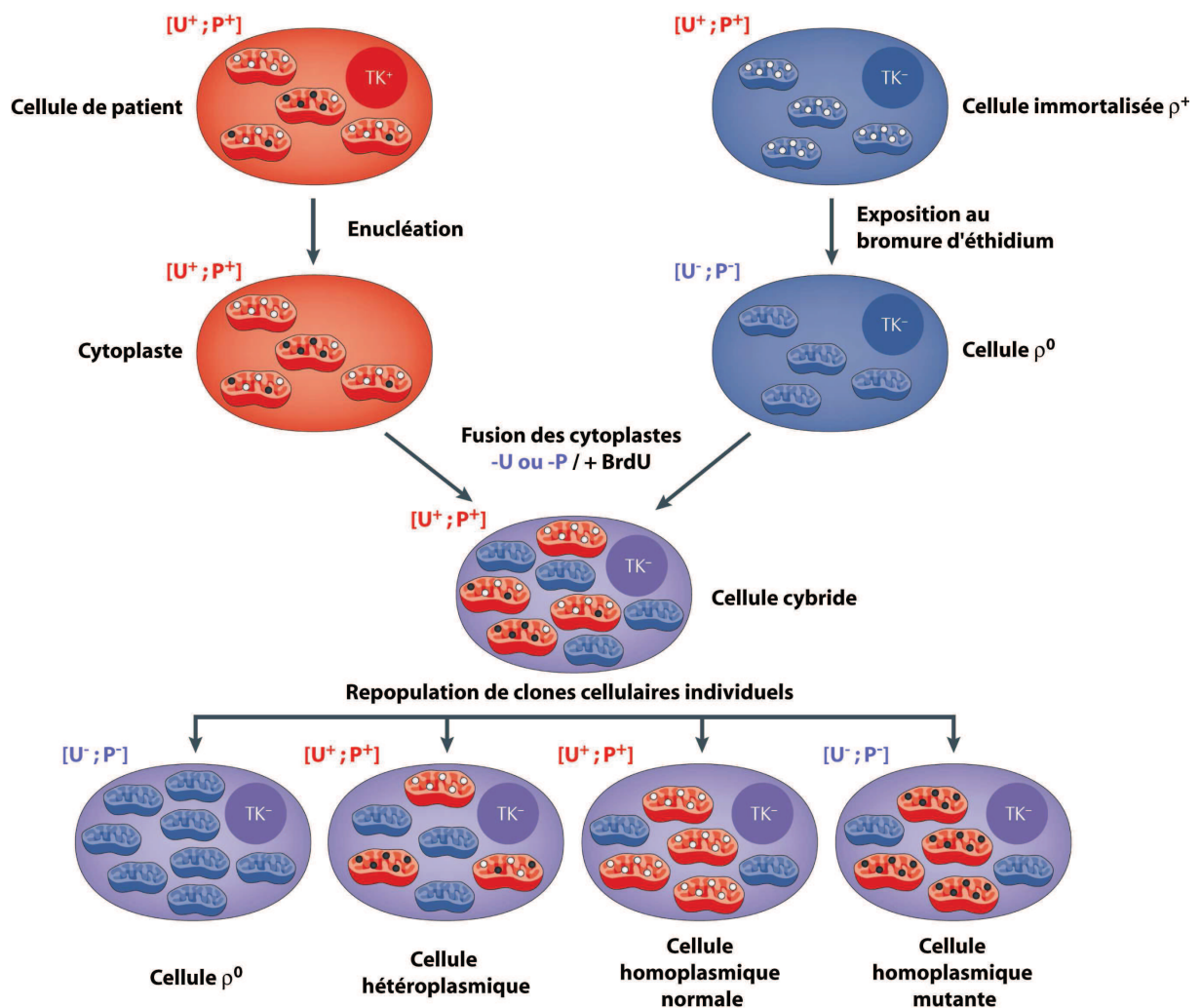


Figure 23 : Création de cellules cybrides

Les cellules cybrides sont issues de la fusion de cytoplastes énucléées de patients malades (rouge) et de cellules ρ^0 immortalisées (bleu) déficientes en thymidine kinase (TK^-). Après fusion, les cellules sont sélectionnées sur milieu sans pyruvate ou uridine (-U ou -P) et riche en bromodeoxyuridine (+BrdU). L'ADNmt est représenté sous forme saine (points blancs) et mutée (points noirs). Adapté de (Schon et al., 2012)

3.2 Le modèle levure

Faisant partie des modèles les plus courants et les mieux connus, la levure peut également être utilisée dans l'étude des maladies mitochondriales. Ainsi, il est possible

d'introduire avec une certaine facilité de l'ADN étranger au sein de ses mitochondries et de manipuler son génome mitochondrial, afin d'y ajouter à notre gré une mutation à n'importe quelle position. Cette caractéristique est particulièrement intéressante pour la modélisation de mutations des ARNt, ceux de la levure partageant des similarités structurales avec les ARNt humains. La capacité de *Saccharomyces cerevisiae* à survivre en l'absence d'ADNmt via la fermentation la rend d'autant plus adaptée à l'étude de pathologies dont les conséquences sur le système respiratoire sont des plus sévères. Ainsi, la levure a permis d'étudier les conséquences biochimiques de mutations du gène de l'ATPase 6 (Kucharczyk et al., 2009) ou de surexprimer des suppresseurs de mutations des ARNt tels EFTu (Feuermann et al., 2003) ou la leucyl-ARNt synthétase mitochondriale (De Luca et al., 2006). Malgré tout, il est impossible d'étudier l'effet de toutes les mutations ponctuelles, car les ARNt humains ne présentent pas tous de fortes similarités avec leurs homologues de la levure.

Même si cet organisme semble un atout majeur dans la compréhension des mécanismes pathologiques mitochondriaux, il possède tout de même ses limites. Il est par exemple impossible d'étudier le complexe I, les levures faisant de la fermentation en étant dépourvues. Pour cela, il faudra alors se retourner vers d'autres modèles tel *Yarrowia lipolytica* qui est un organisme aérobique strict et qui possède la fameuse NADH-ubiquinone réductase. L'absence du phénomène d'hétéroplasmie est également un obstacle pour une étude plus poussée de certains mécanismes, même s'il est en théorie possible de le moduler sous certaines conditions (Kerscher et al., 2004).

3.3 Le modèle murin

Tandis que les cellules cybrides et la levure permettent de répondre à des questions plus fondamentales sur les mécanismes qui sous-tendent l'expression des maladies mitochondriales, un modèle murin semble incontournable au regard d'aspects plus appliqués. Même si la souris réunit l'ensemble des critères nécessaires à un bon modèle (cycle de reproduction rapide, grand nombre de génération, génétique bien caractérisée, taille adaptée...) il a tout de même fallu adapter son utilisation à l'étude des maladies mitochondriales. Le premier modèle murin remonte à un peu plus d'une quinzaine d'années et est issu du croisement de 2 lignées présentant des haplotypes distincts (Jenuth et al., 1997). Cette manipulation a résulté en l'obtention d'une souris hétéroplasmique qui au

départ ne présentait que des variants d'ADNmt et ce de manière tissu-spécifique, mais qui au fil des sélections pourrait permettre de mieux comprendre le mécanisme de spéciation tissulaire de l'ADNmt.

L'autre tournant dans l'établissement de modèles murins fut la création de souris modifiées dont l'ADNmt peut être transmis de manière stable aux générations suivantes et dont les altérations sont reliées à un phénotype observable. Baptisées « Mito-mice », ces souris arborent une large délétion de l'ADNmt associée à de multiples symptômes (myopathie, défaillance rénale, anémie, surdité...) mimant le stade précoce du syndrome de Pearson ainsi qu'une durée de vie n'excédant pas quelques mois. Ces animaux se caractérisent également par une augmentation du taux d'hétéroplasmie qui s'accompagne d'une dégénérescence progressive (Nakada and Hayashi, 2011). De tels modèles ont également été développés avec des mutations ponctuelles au niveau des gènes des sous-unités ND6 et COXI (Fan et al., 2008).

Parmi les autres modèles développés, on peut également citer des souris dont les gènes nucléaires régulant la maintenance et la réplication de l'ADNmt ont été mutés. Ainsi, la polymérase γ (Trifunovic et al., 2004), l'hélicase Twinkle (Tynismaa et al., 2005) ou le facteur TFAM (Larsson et al., 1998) peuvent être étudiés plus en détails.

Ces différents modèles sont non seulement utilisés pour la compréhension des mécanismes qui mènent à l'émergence de pathologies, mais servent également à la mise au point de nombreuses stratégies thérapeutiques.

4. Stratégies thérapeutiques

Considérées comme rares, on estime que les maladies mitochondriales touchent environ 1 individu sur 5 000 (Bannwarth et al., 2013). Malheureusement, bien que les recherches sur les mécanismes qui gouvernent ces maladies aient fait de prodigieuses avancées, il n'existe à ce jour aucun traitement efficace pour combattre de telles affections. Malgré cela, diverses stratégies sont envisagées pour tenter d'enrayer ces maladies et ce à différents niveaux.

4.1 Prévention de la transmission des maladies génétiques

Comme le dit le célèbre adage « Mieux vaut prévenir que guérir ». Selon cette idée, pour éviter l'émergence d'une maladie mitochondriale, la première solution serait donc d'enrayer la transmission des caractères délétères à la descendance. Pour cela, rappelons que cette transmission peut être autosomique et suivre un schéma mendélien pour une mutation au sein de l'ADNn, ou bien se faire uniquement via la lignée maternelle dans le cas d'une mutation de l'ADNmt. Le caractère aléatoire des mutations associées à cette double origine rend le diagnostic pré-natal compliqué. Dans le cas d'une mutation mitochondriale, la meilleure option serait de prévenir cette transmission en substituant le génome muté par un génome sain. Pour cela, les médecins disposent de 2 méthodes : le transfert cytoplasmique et le transfert pro-nucléaire.

La première approche, initialement utilisée pour augmenter les chances de reproduction assistée, consiste à diluer l'ADNmt muté au sein de l'oocyte en y transférant un pool de mitochondries saines. Mais la proportion de mitochondries surnuméraires ne peut dépasser un tiers du contenu total en ADNmt. Cette limitation explique les changements minimes observés, mais également le fait que certains nouveau-nés aient toujours un contenu mitochondrial hétéroplasmique à la naissance (Fulka et al., 2007). L'approche par transfert pro-nucléaire consiste quant à elle à transférer le noyau d'un oocyte fertilisé au sein d'une cellule énucléée et à réimplanter cet œuf dans l'utérus d'une mère porteuse (Brown et al., 2006). Cette technique ayant fait ses preuves chez des singes (Tachibana et al., 2009), elle a ensuite été approuvée par les autorités anglaises qui ont permis sa réalisation chez l'être humain. C'est ainsi qu'une femme atteinte d'un syndrome MELAS a eu recours à cette procédure et a donné naissance à un enfant sain (Craven et al., 2011). Outre les difficultés techniques et le manque de recul sur cette approche, c'est le conflit éthique qui guette les médecins. En effet, avec l'utilisation d'embryons et en faisant appel à une tierce personne via la mère porteuse, nous agissons dans une sphère qui nécessitent une surveillance des lois bioéthiques et un encadrement très strict de la procédure. Alors bien que cette approche constitue une alternative thérapeutique très encourageante, de futures études sont indispensables pour la valider.

4.2 Diminution du taux d'hétéroplasmie

Une des nouvelles stratégies thérapeutiques mise en œuvre vise à induire une diminution du taux d'hétéroplasmie et ce en diminuant la proportion de copies mutées du génome mitochondrial. Cette stratégie dite anti-génomique s'appuie sur une des particularités des mitochondries, à savoir l'hétéroplasmie qui autorise la coexistence du génome sain et muté au sein de la même cellule. Pour tirer parti de ce fait, la stratégie anti-génomique peut être mise en place de plusieurs manières que nous allons décrire dans les pages qui suivent.

4.2.1 Utilisation d'enzymes de restriction

La première solution consiste à détruire purement et simplement le génome mitochondrial mutant. Cette inhibition peut être réalisée par l'utilisation d'une endonucléase encodée par le génome nucléaire et fusionnée à un peptide signal. Celle-ci une fois importée dans les mitochondries clivera l'ADNmt mutant, seul à détenir le site de clivage ciblé par l'endonucléase. Cette stratégie s'appuie sur l'existence de sites de restriction créés avec l'apparition d'une mutation et n'est rendue possible que par la présence d'un site de restriction uniquement au sein du génome mutant. Ce site étant reconnu par l'enzyme de restriction il va s'en suivre une diminution du nombre de molécules d'ADNmt mutées, une augmentation de la proportion des molécules saines et la reprise de la production d'ATP. Cette méthode a été initialement développée avec des cellules cybrides contenant de l'ADNmt de rongeurs dont la version mutée est reconnue par l'enzyme *PstI* (Srivastava and Moraes, 2001). Par la suite, cette approche a été adaptée pour diminuer le taux d'hétéroplasmie d'une mutation affectant le gène de l'ATPase 6 (T8993G). Cette mutation crée l'apparition d'un site *SmaI* unique (Alexeyev et al., 2008) et est liée à un syndrome NARP (rétinite pigmentaire caractérisée par un retard du développement) et à une de ces variantes plus sévères (syndrome MILS), lorsque le taux d'hétéroplasmie dépasse la barre des 90% (DiMauro and Schon, 2003). Mais l'utilisation de l'enzyme *SmaI* fusionnée à un peptide signal a permis d'en diminuer l'effet.

Il est également possible de cibler spécifiquement un organe via l'utilisation de vecteurs adénoviraux AAV (Adeno Associated Virus). Ainsi l'injection de vecteurs

cardiotropiques et hépatotropiques ont permis de délivrer l'enzyme *ApaLI* dans le cœur et le foie et d'induire un déplacement du niveau d'hétéroplasmie (Bacman et al., 2010).

Bien que puissante, l'utilisation de cette méthode à des fins thérapeutiques dépend du niveau d'hétéroplasmie initial et est limitée par une faible fréquence de mutations pathogènes créant un site de restriction unique. Pour tenter de repousser cette limite, il a alors fallu imaginer d'autres vecteurs.

4.2.2 Utilisation de nucléases à doigt de zinc

Si au lieu de cibler une séquence prédéfinie, on pouvait définir cette séquence il serait alors possible d'étendre considérablement le champ d'action de cette stratégie. C'est sur ce principe que se base le développement des nucléases à doigt de zinc (ou ZFN pour Zinc-Finger Nuclease) qui ont été créées pour cibler de manière spécifique une séquence d'intérêt. Ces ZFN sont des peptides composés de 3 à 9 domaines en doigt de zinc assurant une liaison spécifique de l'ADN sur 3 nucléotides (Klug, 2010) ainsi que d'un domaine *FokI* qui est une endonucléase non spécifique (Figure 24).

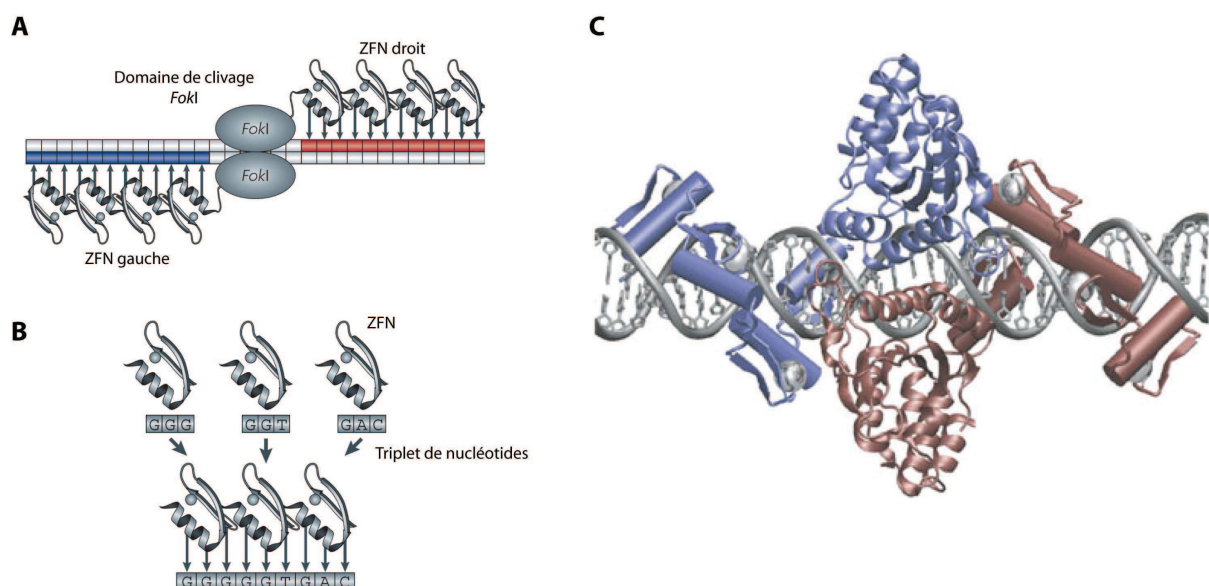


Figure 24 : Organisation et structure des nucléases à doigt de zinc (ZFN)

(A) Schéma d'une ZFN lié à de l'ADN. Chaque ZFN s'organise en dimère avec 2 domaines *FokI* (en gris) et 2 domaines de liaisons à l'ADN (ZFN gauche et droit). (B) Assemblage modulaire des ZFN. Les ZFN reconnaissent un triplet de nucléotides et leur organisation séquentielle permet de cibler une séquence spécifique. (Urnov et al., 2010) (C) Modèle tridimensionnel d'un ZFN. Le ZFN est fixé sur l'ADN (gris) comme présenté en (A). On distingue sous forme de cylindres les ZFN gauches (bleu) et droits (rouge) tandis que les domaines *FokI* sont représentés sous forme de rubans. Les sphères grises représentent les ions Zn^{2+} (Miller et al., 2007)

En arrangeant à souhait ces différents triplets de liaison à l'ADN, il est alors possible de créer une molécule sur-mesure capable de s'hybrider à une séquence spécifique. Une fois fixée, c'est le domaine *FokI* qui entre en action. Généralement sous forme d'hétérodimères, l'organisation structurale des ZFN a été repensée sous forme de monomères dont les 2 domaines sont séparés par une charnière flexible (Minczuk et al., 2008) ou bien encore en associant 2 domaines *FokI* pris en sandwichs entre 2 domaines de liaison à l'ADN (Mori et al., 2009). Ces protéines peuvent également être couplées à une méthyltransférase qui va modifier l'ADN ciblé et le dégrader. C'est par cette voie qu'ont été effectués les premiers développements au sein des mitochondries (Minczuk et al., 2006) et s'en suivirent l'utilisation des monomères ayant pour but de cliver un ADNmt mutant associé à la mutation NARP T8993G (Minczuk et al., 2008). Cette destruction de l'ADNmt mutant a permis de doubler la proportion d'ADNmt sauvage et ce 48h après l'expression. Mais bien que ces facteurs possèdent un signal de localisation mitochondriale, les ZFN semblent également être retrouvés dans le noyau. Pour contrecarrer cette erreur d'aiguillage, il est possible d'ajouter un signal d'export nucléaire mais ceci aurait tendance à rendre encore plus difficile leur adressage au sein des mitochondries.

4.2.3 Stratégie anti-réplivative

Hormis le fait de détruire le génome muté, une méthode alternative consiste à en inhiber spécifiquement la réplication. Pour cela, les agents susceptibles d'induire cette inhibition doivent être non seulement capables de reconnaître l'ADNmt mutant, de s'y fixer avec une haute affinité mais également de bloquer la machinerie de réplication (**Figure 25**). Cette approche a été amorcée via le développement de PNA (ou Peptide Nucleic Acids) qui sont de petites molécules artificielles présentant une forte affinité pour l'ADNmt (Chinnery et al., 1999). Les PNA sont des dérivés d'acides nucléiques qui possèdent un squelette peptidique non chargé, et sont capables de former un duplex avec de l'ADN simple brin en obéissant aux règles régissant un appariement de type Watson-Crick (**Figure 25**). Il a ainsi été démontré que ces molécules pouvaient *in vitro* inhiber la réplication de l'ADNmt mutant qu'ils ciblent (Taylor et al., 1997). Celui-ci étant porteur d'une mutation reliée à un syndrome MERRF, un PNA de 11-mer a pu induire un arrêt spécifique de la réplication au niveau de la position ciblée. Bien qu'attrayante, cette approche se heurte à un obstacle de taille en étant

dans l'impossibilité de franchir *in vivo* la membrane interne des mitochondries et ce malgré la présence d'un peptide d'adressage ou de cations lipophyliques. Cette imperfection rend dès lors cette stratégie inapplicable dans des cellules vivantes. Pionniers de cette méthode, les PNA ont été développés et ont conduit à l'obtention de molécules réunies sous le terme générique de CMCO (Cell Membrane Crossing Oligomers) dont la polarité tente d'être accrue mais dont l'efficacité reste encore à démontrer (Kyriakouli et al., 2008).

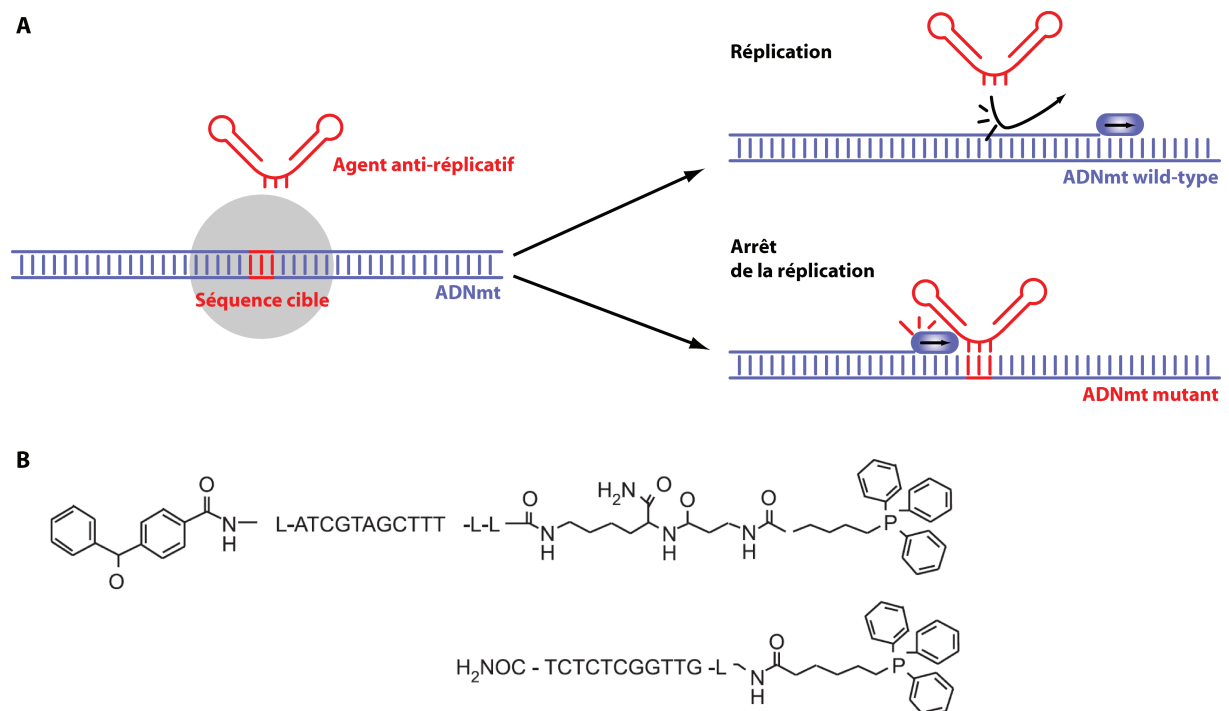


Figure 25 : Stratégie anti-répllicative et structure des PNA

(A) Représentation schématique de la stratégie anti-répllicative. Dans le cas d'un ADNmt muté, l'agent anti-réplcatif (en rouge) est capable de s'hybrider de manière spécifique à la séquence cible et d'induire un arrêt de la réplication. Modifié de (Comte et al., 2013) **(B)** Exemple de structures de PNA (Peptide Nucleic Acids). Les exemples présentés ici ciblent le gène ND5 (en haut) et la mutation A8344G (gène de l'ARNt^{LYS}) associée à un syndrome MERRF (en bas). (Smith et al., 2004)

Seul point noir dans le développement de cette stratégie, l'import de molécules artificielles au sein des mitochondries est un challenge extrêmement difficile à relever. Pour y parvenir, une solution serait de tirer parti de la voie d'import naturelle de molécules au sein des mitochondries. Ce sujet sera abordé plus en détails dans le **Chapitre 4.3.2**.

4.2.4 Enrichissement en ADNmt sauvage

Pour enrichir le contenu mitochondrial en ADNmt et que la cellule délaisse la maintenance de l'ADNmt muté, différentes stratégies peuvent être envisagées. La première d'entre elles est de suivre une diète cétogène, c'est-à-dire un régime alimentaire à très basse teneur en glucides. Même si les mécanismes associés à cet effet sont encore méconnus, il semblerait que cette stratégie soit bénéfique pour les individus qui la suivent. L'exposition de lignées cellulaires à des corps cétoniques issus d'un métabolisme incomplet des acides gras résulte en une augmentation du nombre de copies d'ADNmt sauvage (Santra et al., 2004). Déjà utilisée dans des cas d'épilepsie (Kang et al., 2007), l'astreinte à ce régime alimentaire semble avoir également des bienfaits sur la production de ROS (Maalouf et al., 2007) et assurer une protection neuronale (Noh et al., 2008). Des souris sujettes à un déficit au niveau de l'hélicase Twinkle et accumulant des défauts au sein de leur génome mitochondrial ont été soumises à la diète cétogène. On observe consécutivement à ce traitement une amélioration des symptômes, même si l'on ne note aucune variation quantitative ou qualitative de l'ADNmt (Ahola-Erkila et al., 2010).

La seconde méthode consiste à induire une régénération musculaire par la stimulation des cellules satellites. Ces cellules indifférenciées hébergées au sein du muscle squelettique sont capables de remplacer ou de réparer les fibres musculaires endommagées (Hawke and Garry, 2001). Leur activation peut être stimulée mécaniquement par l'exercice ou chimiquement ce qui va les amener à être incorporées dans les fibres musculaires. Possédant un niveau de mutation très bas, ces cellules constituent une source d'enrichissement pour le pool de génomes sains et vont promouvoir un shift hétéroplasmique. Cette stratégie a déjà été employée avec succès chez un patient porteur d'une mutation au niveau du gène de la sous-unité COXI et soumis à une série d'injections de bupivacaïne, un puissant anesthésique local (Andrews et al., 1999).

4.3 Remplacement des gènes mitochondriaux défectueux

4.3.1 Transduction de protéines et transfert de gènes

L'une des hypothèses expliquant la rétention de certains gènes de protéines dans l'ADNmt est la grande hydrophobicité de ces protéines. Dans le cas où l'une d'entre elles viendrait à être défectueuse, introduire une version saine serait une véritable prouesse mais une stratégie permet d'importer de telles protéines en faisant fi de leurs paramètres physico-chimiques. Cette stratégie nommée transduction ou protofection fait suite à la découverte de protéines en possession de domaines leur permettant de pénétrer aisément dans la cellule (Yamada et al., 2007). Un de ces domaines est un petit peptide cationique dérivé d'une protéine du HIV assurant son passage au travers de la membrane cellulaire, la protéine TAT (Becker-Hapak et al., 2001). La fusion de ce peptide à une protéine mitochondriale pourvue en plus d'une séquence d'adressage mitochondriale permet son adressage dans le compartiment subcellulaire. Déjà réalisé dans le cas d'un déficit en lipoamide déshydrogenase (Rapoport et al., 2008), cet assemblage a permis la création d'un domaine de transduction (MTD pour Mitochondrial Transduction Domain) qui a été couplé au facteur de transcription TFAM. Cette construction a ensuite été envoyée vers la mitochondrie avec succès et sans que l'activité de liaison du facteur ne soit altérée (Keeney et al., 2009). Le résultat de ce transfert a pu être observé par une augmentation du contenu cellulaire en ADNmt dans des cellules cybrides, ainsi que par une amélioration des capacités respiratoires des cellules et ce même dans des cellules non affectées par la mutation ciblée. Le devenir de ces molécules reste à étudier car l'une des faiblesses de cette méthode est la courte durée de vie des composés.

La transduction n'est pas le seul moyen d'assurer le remplacement d'une protéine défectueuse, cette manipulation peut également être effectuée via l'utilisation de vecteurs viraux. Cette approche a été développée il y a plus d'une dizaine d'années pour une myopathie présentant un déficit de la protéine ANT1 qui pourvoit la translocation de nucléotides de l'ATP à l'ADP (Graham et al., 1997). Le résultat du transfert de ce transgène est la formation d'un complexe actif, la restauration des fonctions enzymatiques et un recouvrement des fonctions physiologiques associées (Flierl et al., 2005). Malgré tout, pour

que l'effet thérapeutique de ce vecteur soit étendu, le traitement doit se faire de manière néonatale, sans cela, l'effet ne se limitera qu'à la zone d'injection.

4.3.2 Import d'ARNt

Comme nous l'avons déjà vu, la moitié des mutations logées dans l'ADNmt le sont au niveau des gènes d'ARNt, ce qui induit kyrielle de maladies associées à un dysfonctionnement de ces facteurs. Ces mutations réduisent le niveau et la proportion d'ARNt aminoacylés, ce qui résulte en des défauts de la traduction et de la chaîne respiratoire. Pour tenter d'y remédier, une solution consiste à tirer parti de la voie d'import des ARN dans les mitochondries, mécanisme qui semble être l'unique voie naturelle pour adresser des acides nucléiques dans ces organites. Cette propriété constitue dès lors un moyen idéal d'introduire dans les mitochondries des molécules capables de restaurer les fonctions mitochondriales. Notre laboratoire est largement impliqué dans l'étude de ce mécanisme et dans le développement d'outils naturels à potentiel thérapeutique.

Au risque de paraître quelque peu égocentrique, ce qui n'est absolument pas le cas, nous en sommes juste très fiers ;-), arrêtons-nous sur les travaux que nous développons au laboratoire. A ce jour, nous avons développé avec succès 2 modèles thérapeutiques qui s'appuient sur l'étude des caractéristiques structurales de l'ARNt^{Lys}_{CUU} (TRK1) de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. De précédentes études menées au laboratoire ont pu démontrer que des variants de cet ARNt cytosolique pouvaient être importés dans les mitochondries humaines pour compenser les défauts respiratoires dus à un dysfonctionnement de l'ARNt^{Lys} mitochondrial associé au syndrome MERRF (Kolesnikova et al., 2004). Ainsi, il a été possible de partiellement restaurer la traduction et les fonctions respiratoires. Plus récemment, nous avons montré qu'il était possible de traiter les effets d'une mutation ayant lieu au niveau du gène de l'ARNt^{Leu} associée au fameux syndrome MELAS (Karicheva et al., 2011). Là encore ces constructions ont été modelées sur la base de l'ARNt^{Lys} de levure, auquel nous avons ajouté les déterminants d'aminacylation de l'ARNt^{Leu}. Une transfection transitoire à l'aide de ces constructions a permis d'obtenir un recouvrement partiel des fonctions mitochondriales. Même si dans le cas présent les résultats obtenus sont encourageants, force est de constater que ces résultats souffrent d'une efficacité transitoire et de la toxicité de la procédure de transfection.

Une autre approche consiste à employer le complexe multiprotéique RIC (RNA Import Complex) de *Leishmania Tropica*. Ce système permettrait de restaurer les fonctions mitochondriales diminuées en compensant le dysfonctionnement d'un ARN déficient. Par cette voie, il serait en théorie possible d'importer l'ensemble des ARNt cytosoliques (Mahata et al., 2006) et ainsi de corriger bon nombre de mutations, comme illustré par l'import de l'ARNt^{Lys} ou d'ARN antisens dans des cellules humaines en culture (Mukherjee et al., 2008). Mais cette méthode bien qu'attrayante fait l'objet de nombreuses controverses qui nécessitent de plus amples investigations pour être dissipées.

Un défaut structural dû à une mutation d'un ARNt peut se traduire par une diminution de son niveau d'aminacylation. Pour compenser cet effet, il est alors possible de surexprimer des ARNt synthétases. Cette procédure a été effectuée pour le gène LARS2 (leucyl-ARNt synthétase) et la mutation A3243G pour laquelle il a été observé une augmentation de la consommation en oxygène proportionnelle au niveau de la synthétase, sans pour autant faire varier la synthèse protéique (Li and Guan, 2010).

4.3.3 Expression allotopique de protéines

La stratégie allotopique consiste en l'expression nucléaire du gène d'intérêt, suivie par l'adressage de son produit d'expression dans les mitochondries où il remplacera son homologue mutant. Cette stratégie nécessite de s'assurer de l'adéquation entre le gène mitochondrial et le code génétique universel, et de doter la protéine d'un signal d'adressage mitochondrial. Cependant, cette approche est limitée par la grande hydrophobicité des protéines, ce qui compromet fortement leur import. Le premier essai de stratégie allotopique a été effectué dans la levure avec l'ATPase 8. La protéine fut exprimée, importée et assemblée avec succès dans le complexe V où elle complémenta des cellules de levures délétantes (*atp8Δ*) (Gray et al., 1996). Plus récemment, c'est le gène de l'ATPase 6 qui a fait l'objet de cette stratégie à l'encontre d'une mutation associée à un syndrome NARP dans des cellules humaines (Manfredi et al., 2002). *A contrario*, certaines protéines n'ont pas pu être importées par ce système, telle la sous-unité ND4 qui entraîne la formation d'agrégats cytoplasmiques obstruant les pores mitochondriaux. Pour cette raison, une autre idée a été développée pour adresser directement des ARNm vers la surface des mitochondries et permettre un import co-translationnel, évitant ainsi la formation de ces agrégats (Bonnet et

al., 2008). En dépit de la récupération des fonctions respiratoires, ce genre de stratégie reste à tester sur des modèles animaux.

4.4 Elimination des intermédiaires toxiques

Lactate, anion superoxyde et autres ROS sont autant de poisons qui en s'accumulant dans la cellule, vont conduire au dérèglement des complexes respiratoires et à l'apparition de multiples maladies. L'élimination de ces intermédiaires toxiques est non seulement un moyen de repousser ces affections, mais également d'améliorer les effets obtenus pour les stratégies thérapeutiques déjà évoquées.

Produit du métabolisme du pyruvate, le lactate peut dans le cas d'insuffisances respiratoires s'accumuler dans le sang et conduire à de sévères neuropathies. Pour en diminuer la concentration, il est possible de le tamponner à l'aide de bicarbonate ou de dichloroacétate (Warner and Vaziri, 1981). Les quinones, plus connues sous le terme générique d'antioxydants et souvent prôner dans le monde de la publicité, sont des transporteurs d'électrons entre les complexes I/II et III. Parmi ces composés on trouve le CoQ10 (Di Giovanni et al., 2001), l'idebenone (Meier and Buyse, 2009) ou bien encore du MitoQ dont l'utilisation permet de prévenir la peroxydation radicalaire et de protéger des dommages causés au complexe I (Adlam et al., 2005). Les prochaines années nous en diront plus sur ces différents composés.

D'autres stratégies ont pour but d'optimiser la capacité de synthèse de l'ATP, ou bien de contourner les défauts du système de phosphorylation oxydative et sont décrites plus en détails dans (Wenz et al., 2010).

Comme nous l'avons vu, de nombreuses stratégies dont celle que nous développons au laboratoire exploite les voies d'import présentes chez les mitochondries. Pour mieux comprendre ces stratégies, intéressons-nous à présent aux mécanismes qui assurent cet import.

III. Import mitochondrial

Même si les mitochondries disposent de leur propre génome, elles sont tout de même assujetties à l'ADN nucléaire qui est le dépositaire de 99% des gènes nécessaires à leur bon fonctionnement. Ainsi, les mitochondries sont dans l'obligation d'importer la plupart de leurs protéines mais également certains ARN. Pour illustrer ce propos, nous allons diviser le chapitre suivant en 2 grandes parties, la première traitera de manière succincte de l'import protéique puis nous nous attarderons un peu plus sur l'import des ARN.

1. Import des protéines

On estime à près de 1 000 le nombre de protéines importées dans les mitochondries chez l'Homme et impliquées dans divers processus cellulaires (**Figure 26**) (Taylor et al., 2003).

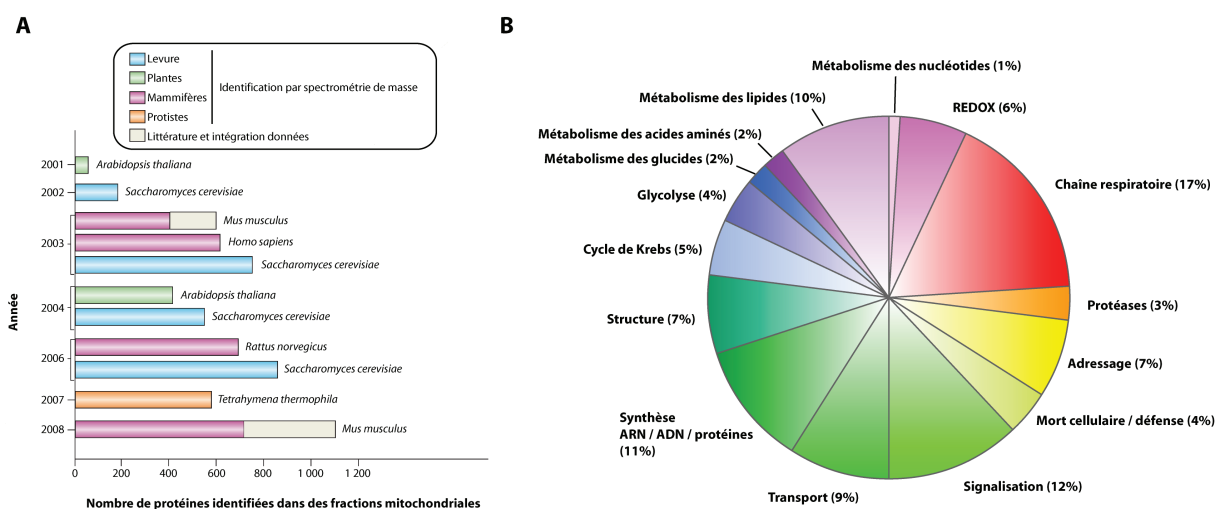


Figure 26 : Le protéome mitochondrial

(A) Détermination du protéome mitochondrial chez différents organismes. La détermination a été essentiellement effectuée par spectrométrie de masse chez la levure (bleu), les plantes (vert), les mammifères (rose) et les protistes (orange). Cette analyse a été recoupée avec les données déjà compilées dans la littérature. Adapté de (Schmidt et al., 2010) **(B)** Répartition fonctionnelle des protéines mitochondriales. Cette répartition fonctionnelle a été effectuée à partir du protéome mitochondrial d'une cellule cardiaque. Les 498 protéines répertoriées ont été classées en fonction de tests fonctionnels et du répertoire mis en place par le NCBI. Adapté de (Taylor et al., 2003)

Tout comme les protéines à destination des chloroplastes ou des péroxysomes, les protéines mitochondriales sont synthétisées au niveau du cytosol par la machinerie de traduction classique, puis dirigées vers les mitochondries où elles seront importées. Durant

le trajet qui les mène jusqu'aux mitochondries, les protéines se doivent de protéger leurs parties hydrophobes jusqu'à ce qu'elles atteignent la membrane externe. Une fois à ce niveau, les protéines empruntent le complexe TOM, traversent l'espace inter-membranaire et enfin, mus par une force fournie par la mitochondrie, elles s'insèrent au sein de la bicouche lipidique. Les protéines à destination de la matrice vont pour leur part franchir le complexe TIM (**Figure 27**).

Ces complexes qui régulent le trafic mitochondrial ne fonctionnent pas comme des unités indépendantes, mais sont intégrés dans de véritables réseaux dynamiques. Ainsi par cette interconnexion, ils sont liés au réticulum endoplasmique et peuvent interagir avec les machineries cellulaires qui gouvernent le fonctionnement bioénergétique et morphologique des mitochondries.

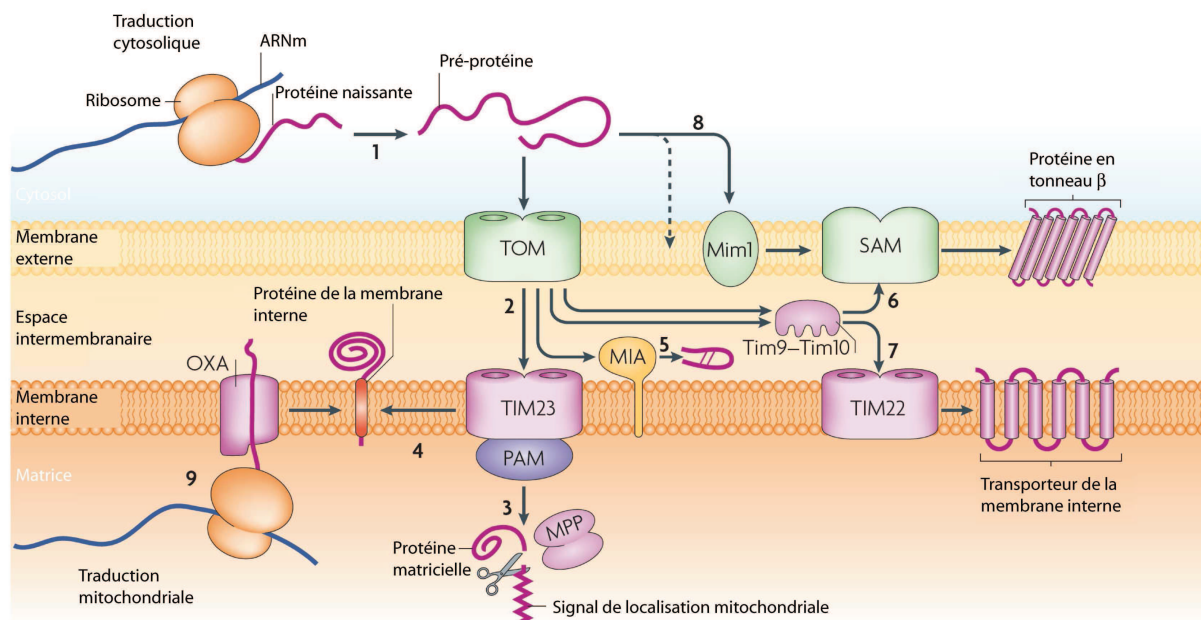


Figure 27 : La voie générale d'import des protéines

La plupart des protéines mitochondriales sont synthétisées dans le cytosol **(1)** avant d'être conduites jusqu'au complexe TOM qui leur fait franchir la membrane externe **(2)**. Au niveau du complexe TIM, les protéines sont soit internalisées dans la matrice où on leur ôte leur pré-séquence **(3)** ou intégrées au niveau de la membrane interne **(4)**. Après avoir passé le complexe TOM, les protéines peuvent également être prises en charge par la machinerie d'assemblage de la membrane interne (MIA) **(5)**, incluses dans la membrane externe **(6)** ou aller dans la matrice via un autre transporteur de la famille des TIM **(7)**. D'autres protéines n'empruntent pas les transporteurs habituels **(8)** ou peuvent être traduites dans la mitochondrie **(9)**. Adapté de (Schmidt et al., 2010)

Jusqu'en 2003, seulement 2 grandes voies d'import menant à la membrane interne ou à la matrice étaient identifiées. Depuis, les données sur la biogenèse des protéines n'ont cessées de s'accumuler, essentiellement par le développement des analyses protéomiques qui ont permis l'identification de nouveaux transporteurs alternatifs. L'un des derniers

complexes identifiés est le complexe MINOS (Mitochondrial INner membrane Organizing System) qui interagit avec les translocases de la membrane externe, elles-mêmes connectées au réticulum endoplasmique. Ce complexe constitue ainsi une véritable clé de voûte pour l'architecture et la biogenèse des mitochondries ([van der Laan et al., 2012](#)).

Nous ne rentrerons pas plus en détails sur les mécanismes d'import des protéines tant le champ d'investigation est vaste et quelque peu hors sujet quant à notre objectif. Nous recommandons alors au lecteur de consulter les très bonnes revues de Nikalaus Pfanner ([Rehling et al., 2004](#); [Schmidt et al., 2010](#)) et Agnieszka Chacinska ([Chacinska et al., 2009](#)) pour de plus amples informations.

A présent, nous allons concentrer notre attention sur une autre voie d'import, celle des ARN.

2. Import des ARN

Alors que les mécanismes et les acteurs qui gouvernent l'import des protéines sont relativement bien caractérisés, la façon dont les mitochondries importent des ARN reste encore à éclaircir. En effet, même si ce mécanisme est quasi universel et retrouvé dans la plupart des clades, la manière dont il s'effectue ainsi que le nombre et la nature des ARN importés sont autant d'éléments qui en renforcent la complexité. Même si cette voie est empruntée par plusieurs ARN non codants (ARNr, composants de la RNase P et de la MRP, microARN...), ce sont les ARNt qui constituent l'essentiel du pool. L'ensemble des mécanismes mis en place chez différents organismes sont décrits de manière beaucoup plus détaillée dans l'**Article n°1** qui dresse un portrait de l'état actuel de nos connaissances sur le sujet. Nous y développons également les moyens par lesquels ces systèmes peuvent être exploités à des fins thérapeutiques. En guise de préambule à cet article, je vais donc seulement faire un bref passage en revue de ce que nous allons développer par la suite. Allant de *Trypanosoma brucei* qui est dans l'obligation d'importer la totalité de ses ARNt à l'Homme qui dispose d'un jeu complet au sein de son ADNmt, le nombre d'ARNt importé est comme nous l'avons dit, très variable d'un organisme à l'autre mais ne semble pas dépendre du nombre d'ARNt dont la mitochondrie est dépositaire au sein de son génome (**Tableau 3**).

Organisme	Nombre d'ARNt importés	Preuve de l'importation	Autre type d'ARN importé
Plantes			
<i>Marchantia polymorpha</i>	2	A/B	—
<i>Arabidopsis thaliana</i>	6	A	—
<i>Phaseolus vulgaris</i>	>8	A/B	—
<i>Triticum vulgare</i>	>8	A/B	—
<i>Zea mays</i>	>8	B	—
<i>Solanum tuberosum</i>	>11	B/C	—
Algues			
<i>Chondrus crispus</i>	2	A	—
<i>Porphyra purpurea</i>	2	A	—
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Tous sauf 3	A	—
Champignons			
<i>Allomyces macrogynus</i>	0	A	—
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	(3)	A/B/C/D	—
<i>Spizellomyces punctatus</i>	>10	A	—
<i>Hyaloraphidium curvatum</i>	13	A	—
Protistes			
<i>Jacoba libera</i>	1	A	—
<i>Phytophthora infestans</i>	1	A	—
<i>Reclinomonas americana</i>	1	A	—
<i>Cafeteria roenbergensis</i>	2	A	—
<i>Chysochrysidium synuroides</i>	2	A	—
<i>Ochromonas danica</i>	2	A	—
<i>Thraustochytrium aureum</i>	2	A	—
<i>Dictyostelium discoideum</i>	4	A	—
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	7	A	—
<i>Pedinomonas minor</i>	15	A	—
<i>Paramecium aurelia</i>	19	A	—
<i>Leishmania tarentolae</i>	Tous	A/B/C/D	—
<i>Plasmodium falciparum</i>	Tous	A	—
<i>Theileria parva</i>	Tous	A	—
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tous	A/B/C/D	—
<i>Tetrahymena pyriformis</i>	26	B/C	—
Animaux			
<i>Oscarella carmella</i>	0	A	ND
<i>Homo sapiens</i>	(2)	D	ARNr 5S, RNase P, ARN MRP, microARN
<i>Didelphis virginiana</i>	1	A/D	ND
<i>Crassostrea gigas</i>	4	A	ND
<i>Metridium senile</i>	Tous sauf 2	A	ND

Tableau 3 : Import d'ARN dans le règne vivant ARN

Quelques exemples d'ARN importés chez les plantes (vert), les algues (brun), les champignons (rouge), les protistes (violet) et les animaux (bleu). (A) : Données de séquençage, (B) : Hybridation de type Northern blot, (C) : Données d'expériences de transgénèse, (D) : Système d'importation *in vitro* des ARNt dans les mitochondries isolées. ND : non déterminé. Adapté de (Entelis et al., 2001)

Trypanosoma brucei constitue donc l'exemple parfait pour figurer l'import, l'intégralité des gènes d'ARNt étant l'apanage du génome nucléaire, tous ses ARNt se doivent d'être importés dans la mitochondrie. Seules exceptions à cette règle, l'ARNt^{Met} initiateur et l'ARNt^{Sec} sont contraints de demeurer au sein du cytosol, la mitochondrie ayant recours à une traduction de type bactérienne et étant dépourvue de sélénoprotéines. Pour assurer leur import, les ARNt de *Trypanosoma brucei* font appel au facteur d'initiation eucaryotique eEF1a qui reconnaît une région spécifique de tous les ARNt (Bouzaidi-Tiali et al., 2007) mais face à cela, les complexes de translocation membranaire dont cet organisme dispose sont encore inconnus.

Chez les plantes, l'import d'ARNt ne requiert aucun facteur cytosolique et semble être relié à leur aminoacylation. Ainsi, les ARNt-synthétase seraient susceptibles de jouer un rôle important dans le transport des ARNt vers la membrane mitochondriale. A ce niveau, ce sont les complexes TOM et VDAC qui les prendraient en charge et assureraient leur import vers l'espace inter-membranaire. Face à cela, le ou les complexes impliqués dans le passage des ARNt vers la matrice restent inconnus. Seule information pour le moment, le complexe TIM n'interviendrait pas dans ce mécanisme (Salinas et al., 2006).

Autre modèle, la levure *Saccharomyces cerevisiae* possède un jeu complet d'ARNt, néanmoins, ceci ne l'empêche tout de même pas d'en importer certains. En effet, un ARNt à savoir l'ARNt^{Lys}, est présent en 3 exemplaires : TRK1 (ARNt^{Lys}_{CUU}) et TRK2 (ARNt^{Lys}_{UUU}) tous deux codés par le génome nucléaire et TRK3 (ARNt^{Lys}_{UUU}) encodé par le génome mitochondrial. Ces 3 isoformes coexistent au sein de la cellule. TRK2 est un ARNt strictement cytoplasmique et n'est jamais importé dans les mitochondries alors que face à cela, TRK3 est assigné à l'organite. TRK1 quant à lui réside dans le cytoplasme, mais peut être importé dans la mitochondrie dans le cas où TRK3 viendrait à être défaillant et induire un défaut respiratoire (Kamenski et al., 2007). Pour encadrer son import, 2 facteurs cytosoliques sont nécessaires. Tout d'abord l'énolase qui en se liant à TRK1 induirait un changement de conformation et permettrait au second facteur, le précurseur de la lysyl ARNt synthétase de s'y fixer à son tour (Entelis et al., 2006; Tarassov et al., 1995). Un second cas d'import d'ARNt a été répertorié chez la levure, celui de l'ARNt^{Gln}. Le mécanisme par lequel cet ARNt est rapatrié au sein de la mitochondrie est différent de celui de TRK1. Il ne nécessite aucun facteur cytosolique (Rinehart et al., 2005) et se fait sans qu'aucun potentiel de membrane ne soit appliqué. Les complexes impliqués dans son import ainsi que la raison pour laquelle il est importé restent encore inconnus à ce jour.

Enfin, pour clore ce tour d'horizon, intéressons-nous aux mammifères. Nous y retrouvons le cas préalablement cité de l'ARNt^{Gln} mais il a également été démontré qu'un autre ARN était importé : l'ARN 5S (**Figure 28**). Même si sa fonction reste encore inconnue, il a été démontré qu'environ 5% à 10% de cet ARN était importé dans les mitochondries. 2 éléments structuraux distincts sont impliqués dans l'import de cet ARN (Smirnov et al., 2008) et sont reconnus par au moins 2 facteurs cytosoliques que sont le précurseur de la protéine MRP-L18 et la rhodanèse (Smirnov et al., 2010; Smirnov et al., 2011). Même si des données supplémentaires méritent d'être apportées pour éclaircir la fonction de l'ARNr 5S, il semble

d'ores et déjà évident que si la mitochondrie importe cet ARN, c'est qu'il doit y jouer une fonction essentielle.

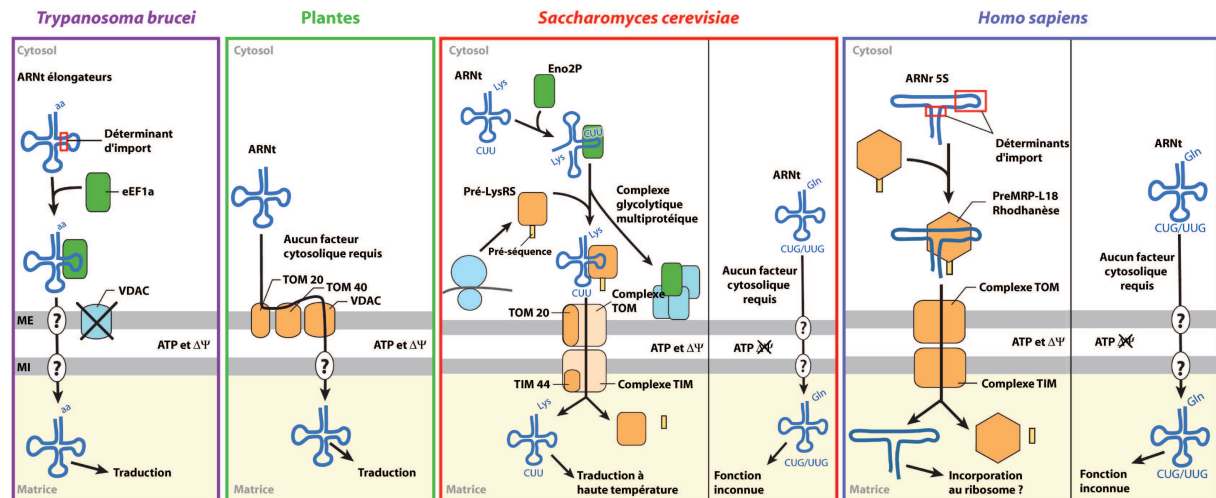


Figure 28 : Les voies d'import des ARN

Les mécanismes et facteurs de l'import d'ARN chez *Trypanosoma brucei* (violet), les plantes (vert), *Saccharomyces cerevisiae* (rouge) et *Homo sapiens* (bleu). Les différents facteurs et complexes de translocation de la membrane externe (ME) et de la membrane interne (MI) sont représentés. Les points d'interrogation (?) représentent les systèmes d'import dont la nature n'a pas encore été identifiée. Adapté de (Schneider, 2011)

Outre les exemples présentés, les mitochondries importent également une endoribonucléase qui catalyse la maturation des ARNt (la RNase P) ainsi qu'un composant de la RNase MRP (Mitochondrial RNA processing) qui est impliqué dans le clivage de l'amorce ARN lors de la réplication de l'ADNmt. Les détails concernant ces molécules, leur import et le moyen de les exploiter à des fins thérapeutiques sont présentées dans l'Article n°1 qui suit.

📄 Article n°1**Mitochondrial targeting of RNA and mitochondrial translation**

Ivan Tarassov^{1,3}, Ivan Chicherin^{1,2}, Yann Tonin¹, Alexandre Smirnov^{1,2}, Piotr Kamenski^{1,2} and Nina Entelis¹ (2013) *Springer series - Book chapter*

¹Department of Molecular and Cellular Genetics, UMR Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie (GMGM), CNRS – Université de Strasbourg, Strasbourg, France

²Molecular Biology Department, Biology Faculty of M. V. Lomonossov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia

³ Corresponding author : i.tarassov@unistra.fr

Chapter 4

Mitochondrial Targeting of RNA and Mitochondrial Translation

Ivan Tarassov, Ivan Chicherin, Yann Tonin, Alexandre Smirnov,
Petr Kamenski and Nina Entelis

Abstract Mitochondrial translation depends on the macromolecular components imported from the cytosol, which include translation factors, ribosomal proteins, aminoacyl-tRNA synthetases, and a variable number of small noncoding RNAs. The last are essentially tRNAs, but other small RNAs, like mammalian 5S rRNA, are also concerned by the RNA mitochondrial targeting pathway. If their importance in mitochondrial translation was demonstrated in each case where it was addressed, the precise function of these molecules differs from one system to another: in many cases they complement lacking mtDNA encoded counterparts, in others can fulfill conditional functions, finally they can complement the lack of needed mitochondrial enzymatic activities. In any case, it appears that the innate capacity of mitochondria to import small RNA molecules is supplied by specific

I. Tarassov (✉) · I. Chicherin · Y. Tonin · A. Smirnov · P. Kamenski · N. Entelis
Molecular Genetics, Genomics, Microbiology (UMR 7156), University of Strasbourg
and CNRS, 21 René Descartes, 67084 Strasbourg, France
e-mail: i.tarassov@unistra.fr

I. Chicherin
e-mail: i.v.chicherin@gmail.com

Y. Tonin
e-mail: yann.tonin@wanadoo.fr

A. Smirnov
e-mail: Skard1@yandex.ru

P. Kamenski
e-mail: peter@protein.bio.msu.ru

N. Entelis
e-mail: n.entelis@unistra.fr

I. Chicherin · A. Smirnov · P. Kamenski
Molecular Biology Department, Biology Faculty of M. V., Lomonosov Moscow State
University, 119991 Moscow, Russia

additional protein, often performing their “second job” to deliver the needed RNA in the organelle. This mechanism, still not understood in details, remains the unique natural pathway of nucleic acids delivery in mitochondria, and is therefore of a significant interest as a tool permitting to target this organelle with potentially therapeutic molecules and thus addressing a very important bulk of human pathologies linked with dysfunctions of mitochondrial translation machinery.

4.1 Introduction

This chapter focuses the role of mitochondrially targeted cytosolic RNA molecules in the organellar translation. Mitochondria import the majority of macromolecules from the cytosol, including almost a thousand of proteins and a various number of small noncoding RNAs. Mitochondrial targeting of RNAs is nowadays to be considered as a quasi-ubiquitous process, found in almost all studied biological systems (for review, see Entelis et al. 2001c; Rubio and Hopper 2011; Salinas et al. 2008). In all studied cases, naturally imported RNAs are small and noncoding: they are essentially tRNAs, but larger RNAs (like 5S rRNA, MRP, or RNase P RNA components) or smaller ones (like microRNAs) were described as mitochondrially targeted. A major part of these molecules clearly refer to protein synthesis machinery (tRNAs, 5S rRNA, RNase P). So far, different cases of RNA import of even similar types of molecules may have different functional implications—sometimes they are clearly essential, sometimes only conditionally important, in some cases their implication in mitochondrial translation is still not evident. The first part of the chapter tries to review these different cases with the emphasis on still unclear functional issues or contradictory data.

Mitochondrial DNA mutations are the recognized source of neuromuscular pathologies (Ruiz-Pesini et al. 2007). This large group of “mitochondrial diseases” includes mutations in virtually all mtDNA encoded genes and often have a strong impact on mitochondrial translation (Smits et al. 2010). One of their main features is the phenomenon of heteroplasmy, meaning the simultaneous presence of mutant and wild-type genomes in the same cell, the level of heteroplasmy determining the pathogenic effect of the mutation. All these pathologies have no efficient classical therapy and many attempts are currently done to develop alternative gene therapy strategies. Two main approaches were proposed—the “allogenic” one was to express in the nucleus the lacking or therapeutically active molecule and to address into mitochondria; and the “antigenomic” one, which aims to decrease the heteroplasmy below the threshold pathogenic level by addressing into the organelle specific recombinant molecules (Smith et al. 2004). If both strategies may use imported protein, nucleic acids delivery into mitochondria appears as more attractive. Therefore, in the second part of the chapter, we shall focus here RNA targeting into mitochondria, since many recent studies were aimed to exploit this pathway as a tool to correct dysfunctions of the mitochondrial translation machinery.

4.2 Imported tRNAs and Mitochondrial Translation

4.2.1 Plants

The situation in higher plants appears as the most evident—up to now, in all cases mitochondrially imported RNA species were limited to tRNAs and, also in all cases, imported tRNA species strictly corresponded to those whose genes were absent in mtDNA (Dietrich et al. 1992; Kumar et al. 1996; Salinas et al. 2008; Schneider and Marechal-Drouard 2000). The mechanism of this pathway is actively studied. Aminoacyl-tRNA synthetases, another component of the translation machinery, were formerly implicated in tRNA mitochondrial targeting (Dietrich et al. 1996; Small et al. 1992), while at the mitochondria level, Voltage Dependent Anion Channel (VDAC) and/or TOM complex were involved in tRNA translocation across mitochondrial membranes (Salinas et al. 2006, 2008).

There still is no evident evolutionary explanation why a given tRNA gene was conserved in mtDNA and the other—not, as well why there is a so significant variation in the imported tRNAs among different plant species, ranging from few to more than a half of the mitochondrial set. One could assume therefore that the emergency of tRNA import was polyphyletic and occurred many times during evolution, maybe in a sporadic way (Kumar et al. 1996). The similarity of mitochondrial and nuclear genetic code in plants may, at some extent, explain this situation: indeed nuclear-encoded and mitochondrially addressed tRNAs not only can function both in cytosolic and organellar translation, but also cannot become potentially toxic nonsense/missense suppressor tRNAs in the cytosol.

The question arises if there exist any regulatory mechanism which would permit to optimize mitochondrial translation by differential tRNA import efficiency. A priori there is no limitation for that, taking into account that mitochondrial subset of tRNA is a minor one comparing to the cytosolic pool. Indeed, in the case of a lower plant cells, in *C. reinhardtii*, mitochondrial abundance of nuclear DNA encoded tRNA was found to be in correlation with mtDNA genes codon usage (Vinogradova et al. 2009), which may reflect the existence of a kind of retrograde control of RNA import or, alternatively, a controlled system of RNA degradation in the organelle.

4.2.2 Trypanosomes

The group of *Trypanosomatidae* represents an extreme case, where all or almost all tRNAs are nuclearly encoded (Hauser and Schneider 1995; Rubio et al. 2000; Schneider 1994; Schneider and Marechal-Drouard 2000; Simpson et al. 1989). The need of these molecules for mitochondrial translation appears as evident, since no mtDNA-coded tRNA genes were ever identified while mitochondrial translation of the kinetoplast DNA (trypanosomal equivalent of mtDNA) is rather

standard. The situation on these protozoans was recently exhaustively described in (Schneider 2011), therefore, we focus here only few translation-related issues.

In such trypanosomatids as *Trypanosoma brucei* or *Leishmania tarentolae*, cytosolic and mitochondrial pools of tRNAs are not identical, the exception concerning the initiator tRNA^{Met} and the tRNA^{Sec}, both found only in the cytosolic compartment of the cell (Geslain et al. 2006; Tan et al. 2002b). This fact refers directly to the absence of functional need of these tRNA species in the mitochondrial compartment. Mitochondrial initiation of translation does not require special eukaryotic initiator tRNA since a portion of mitochondrially imported cytosolic elongator tRNA^{Met} is formylated by specific tRNA^{Met}-formyltransferase (Charriere et al. 2005; Tan et al. 2002a). This formylated elongator tRNA is then recognized by the mitochondrial bacterial type initiation factor. This is just an example of the higher extent of mitochondrial translation flexibility, which is observed also in other species, as described below. Also, as in many other cases, it is difficult to explain how such mechanism was retained in evolution. It clearly demonstrates that many features of mitochondrial translation may have sporadic origins, and therefore being species/genera-specific. On the other hand, it also illustrates strictly classical functional explanation of RNA import in terms of translation processes, without involving “alternative functions” of imported RNA molecules, as for tRNA^{Sec}, whose presence in trypanosomatid mitochondria would be obsolete, in the absence of selenoproteins.

4.2.3 Yeast

In ascomycetes yeast *Saccharomyces cerevisiae* the situation with imported tRNAs is all but simple, taking into account that mtDNA appeared to encode all the set of tRNAs, in theory able to fulfill translational activity (Foury et al. 1998). So far two cases of tRNA import were independently described. The first concerns one out of two cytosolic tRNA^{Lys}, tRNA^{Lys}₁ (tRNA^{Lys}_{CUU}, or tRK1). This cytosolic tRNA was partially found in the mitochondrial compartment of the cell in 1979 (Martin et al. 1979), while the second tRNA^{Lys} (tRNA^{Lys}_{UUU}, tRK2) resided only in the cytosol. The mechanism of tRK1 delivery into yeast mitochondria was studied in details and involved several targeting factors (Enolase-2 as an RNA chaperone and the cytosolic precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase pre-Msk1p) and the TOM/TIM translocators (Entelis et al. 2006; Kamenski et al. 2007b; Kolesnikova et al. 2010; Tarassov et al. 1995), issues recently reviewed elsewhere (Rubio and Hopper 2011; Salinas et al. 2008; Schneider 2011). Up to more recent studies its function in the mitochondria was not clear. Indeed, mtDNA codes for another tRNA^{Lys} (tRK3), which, due to its modification of the wobble position (cmm⁵S²U) was predicted to decode both AAA and AAG lysine codons in the organelle. Several alternative functions (like participating in splicing or mtDNA replication priming) were proposed for mitochondrial tRK1 (reviewed in Entelis et al. 2001c), so far these hypotheses never found experimental evidence. Finally, a peculiar mechanism was uncovered. It was shown that mitochondrially encoded tRK3 anticodon wobble base was undermodified (underthiolated) at

higher temperatures, and, as a consequence loses the ability to efficiently decode the very rare mitochondrial AAG codons, while the imported CUU anticodon bearing tRK1 complements this deficiency (Kamenski et al. 2007a; Tarassov et al. 2007) (Fig. 4.1). This mechanism was the first case of mitochondrial translational

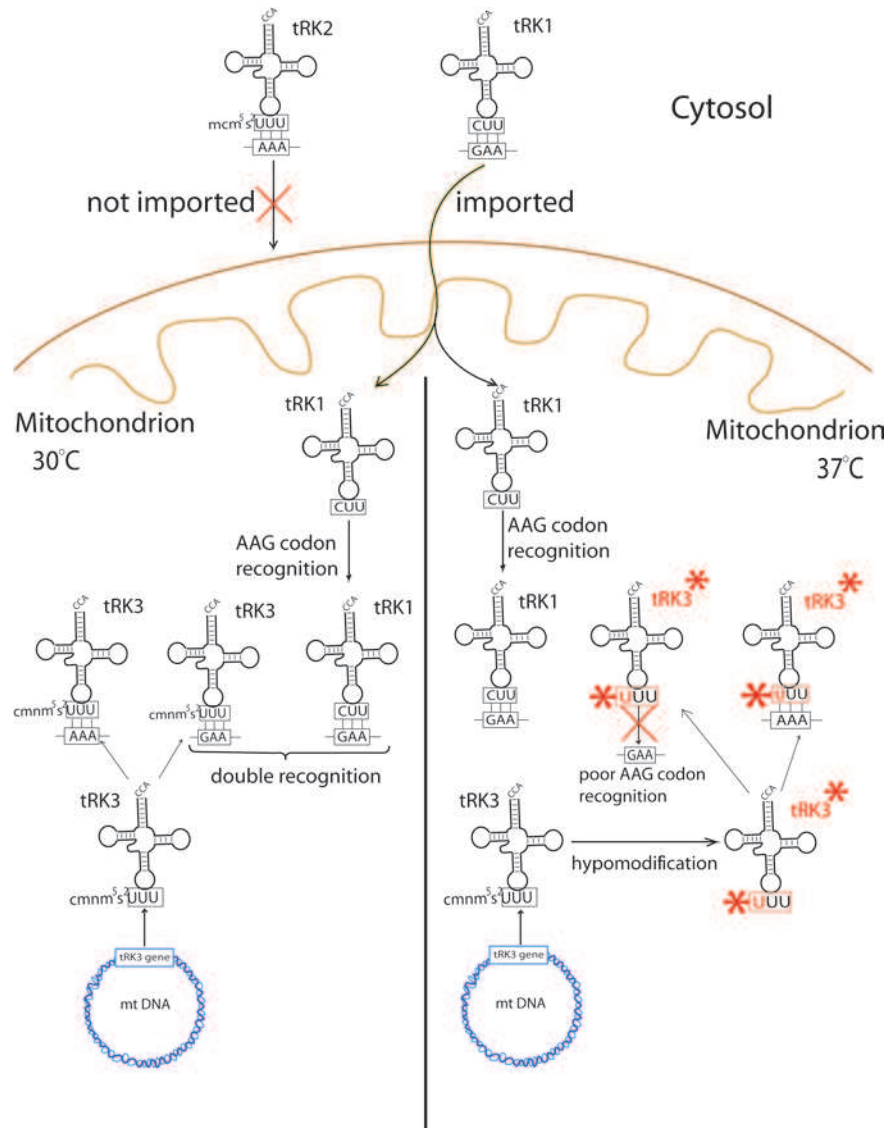


Fig. 4.1 tRNA import into yeast mitochondria is a mechanism of translational adaptation to stress conditions. At the *left* side of the scheme, normal conditions of growth (30 °C), when both lysine codons can be read by mtDNA encoded tRK3. At the *right* side—at higher temperature tRK3 wobble position of the anticodon in undermodified (underthiolated) which prevents efficient decoding of the AAG lysine codon, while imported tRK1 becomes essential for mitochondrial translation

adaptation to stress conditions. So far many questions remains to be solved. tRK1 is imported in mitochondria in a constitutional manner, and not only at higher temperature, while its function in mito-translation becomes detectable only at elevated one. So it is not clear if it participates in translation in a permanent way and if it is more or equally efficient to decode AAG codons in normal conditions. In this context it is worth to stress that tRK1 is aminoacylated by the cytosolic lysyl-tRNA synthetase (KARS), imported into mitochondria in aminoacylated form and cannot then be reacylated in the organelle by the mature mitochondrial synthetase (MSK1), the last one able to charge only tRK3 (Tarassov et al. 1995). This obviously limits the efficiency of tRK1 use in mitochondrial translation. It is still not evident if there exist any regulatory mechanisms governing this targeting. Indeed, it was demonstrated that differential deregulation of the proteasomal degradation of proteins (ubiquitin/26S proteasome system, UPS) may have various effects on tRK1 import (either increasing or decreasing it) (Brandina et al. 2007), which may reflect existence of such a regulation. So, once more, the function of the imported tRNA species was strictly classical while no evidence of any other “alternative” function was ever found.

The second described case of tRNA import in yeasts concerns tRNA^{Gln} species. Formation of Glutaminyl-tRNAs can, in principle, proceed either by a specific glutaminyl-tRNA synthetase (QRS), as in eukaryotic cells and many bacteria, or by misaminoacylation of the corresponding tRNA^{Gln} by the nondiscriminating glutamyl-tRNA synthetase (ERS) with subsequent transamidation of the aminoacyl residue in Glu-tRNA^{Gln} to generate Gln-tRNA^{Gln}, as it is found in the majority of bacteria and all the archaea (Feng et al. 2005; Ibba and Soll 2004). The last pathway is also used in mitochondria, so far in yeast amidotransferase activity has not been characterized for long time and, to explain how the glutamine decoding system could function, a new mechanism involving tRNA import was proposed (Rinehart et al. 2005) (Fig. 4.2a). Following this scheme, mtDNA encoded tRNA^{Gln}_{UUG}, due to a specific wobble base modification (mcm⁵S²U or cmnm⁵S²U, cited differently in different reports), can decode only CAA glutamine codons (hypothesis based on earlier studies, reviewed in Yokoyama and Nishimura 1995). The two isoacceptor tRNAs^{Gln} (anticodons CUG and UUG) would be imported from the cytosol, along with the cytosolic QRS, which proceeds the aminoacylation in the “eukaryotic” fashion permitting decoding of the other two glutamine codons (CAG and CAA). This hypothesis responds to the question how glutamination may occur when no amidotransferase is present. It is also in agreement with the idea that mitochondrial enzyme, mERS, cannot generate Glu-tRNA^{Gln}, the required intermediate for the transamidation pathway (Rinehart et al. 2005). However, more recently, a new heterotrimeric complex with amidotransferase activity (GatA/GatF/GatB) was characterized, which, once assembled in mitochondria, can modify the mtDNA encoded tRNA^{Glu} misacylated by nondiscriminating cytosolic ERS, partially imported into the organelle (Fig. 4.2b) (Frechin et al. 2009). Such a mechanism eliminates the functional need of tRNA^{Gln} import, and indeed, the latter study failed to detect any considerable amount of cytosolic tRNAs^{Gln} in yeast mitochondria. Furthermore, the incapacity of the modified U in the wobble position of the mitochondrial

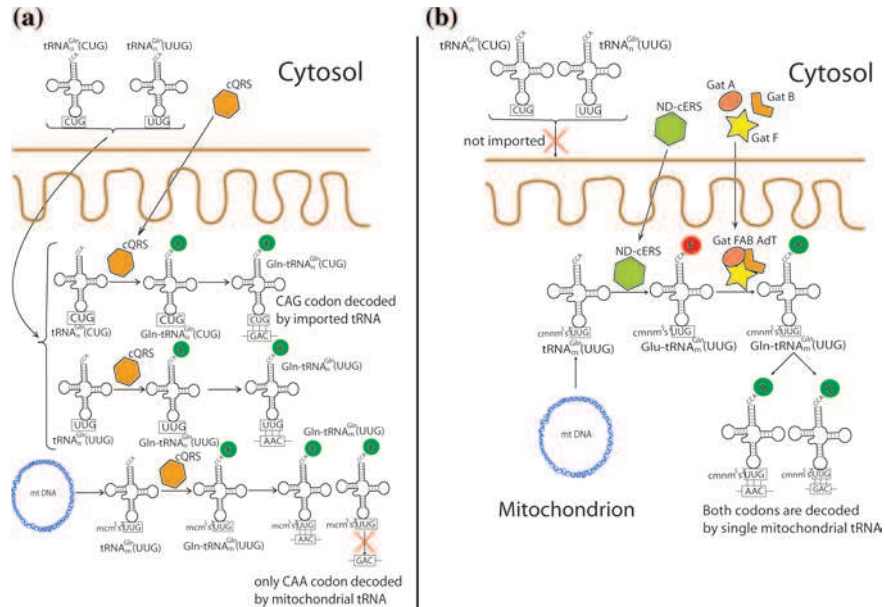


Fig. 4.2 tRNA^{Gln} in yeast mitochondria. **a** The model proposing simultaneous import of both two cytosolic tRNA^{Gln} and the cytosolic QRS. **b** The model proposing the generation of mitochondrial tRNA^{Gln} by the nondiscriminating cytosolic ERS and tripartite amidotransferase (Gat FAB AdT), both imported into mitochondria

tRNA^{Gln}_{UUG}, to pair with both A and G in the codon's first position is not supported by many reports (for example, Kurata et al. 2008; Umeda et al. 2005). Still remains the possibility that both mechanisms may coexist, but the former one being minor in terms of efficiency.

4.2.4 Mammalians

For a number of years it was assumed that mammalian mitochondria do not import any tRNA (Enriquez and Attardi 1996a, b; Enriquez et al. 1996), since no significant amounts of cytosolic tRNAs were detected in these organelles by classical hybridization methods. So far, a more recent study suggested that such pathway may, however, exist. It was proposed that a system which resembles to that proposed for yeast (see above) to import tRNAs^{Gln} into mitochondria would also exist in human cells (Rubio and Hopper 2011; Rubio et al. 2008) basing on the same reasoning as for the yeast system, the authors suggested that the modified wobble U34 of the mtDNA encoded tRNAs^{Gln} would affect decoding CAG codon, according to commonly agreed codon-anticodon recognition rules (Agris et al. 2007; Sprinzl and Vassilenko 2005). So, to fulfil complete set of decoding,

mitochondria must import corresponding nuclear-encoded tRNA^{Gln} isoacceptors (CUG and UUG anticodons) from the cytosol (see the scheme corresponding to the yeast system, Fig. 4.2a). Indeed, these two cytosolic tRNAs were detected in purified rat and human mitochondria by a more sensitive RT-PCR approach (Rubio et al. 2008). These data are in agreement with the fact that mammalian mitochondria were already described as able to import tRNAs in artificial way (Entelis et al. 2001b; Kolesnikova et al. 2002), and also import other RNA molecules in vivo (Magalhaes et al. 1998; Smirnov et al. 2008a; Yoshionari et al. 1994), so their innate capacity to internalize RNA is out of doubt. So far, the fact that these tRNAs are detectable only by RT-PCR indicates on tiny amounts of them in mitochondria. Furthermore, the transamidation pathway, allowing to complement the absence of mitochondrial QRS, was described (Nagao et al. 2009). This last study permitted to demonstrate that human mitochondrial ERS can misaminoacylate the mtDNA encoded tRNA^{Gln} by a glutamate, which is modified by a heterotrimeric transamidase hGatCAB imported into mitochondria. This mechanism makes the functional issue of the cytosolic tRNAs^{Gln} import not evident. The possibility remains open that both pathways are coexisting but the tRNA-based having a minor functional input.

In the context of this chapter, one can also cite the results of a systematic analysis of human mitochondrial transcriptome, where not only cytosolic tRNA^{Gln} was also detected, but also tRNA^{Lys} and tRNA^{Leu} ones (Mercer et al. 2011). However, there is no hint for the moment if this was due to contamination problems or corresponds to the in vivo situation, since no plausible function for cytosolic tRNA^{Lys} and tRNA^{Leu} in human mitochondrial compartment was ever assigned.

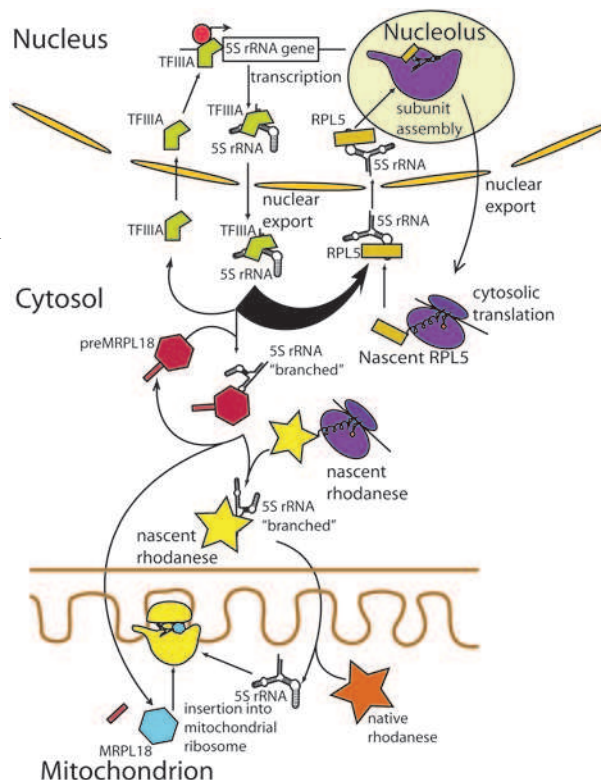
4.3 Import of 5S rRNA in Mammals and Mitochondrial Translation

Found for the first time in beef liver mitochondria, nuclear DNA encoded 5S rRNA appeared to be nearly the most abundant ribonucleic acid species inside the organelles (Yoshionari et al. 1994; Magalhaes et al. 1998; Entelis et al. 2001a). Its presence in mitochondrial matrix was somewhat unexpected, since 5S rRNA genes have disappeared from mitochondrial genomes of animal cells, and this component was believed to be replaced by new proteins, so typical for mitochondrial ribosomes (Smits et al. 2007). Furthermore, no 5S rRNA was detected in large-scale purified mammalian mitoribosomes (Sharma et al. 2003). On the other hand, a recent series of works, focused on function of this small but important molecule, showed clearly that 5S rRNA, being an extremely conservative ribosomal component, administers the clockwork-like mechanism of all main functional sites of ribosomal machine (Smith et al. 2001; Kiparisov et al. 2005; Kouvela et al. 2007). This fact suggests that the total loss of 5S rRNA cannot possibly occur, if only the mitoribosome has not suffered some substantial structural reorganization of its

protein component before (what is probable only in very dynamic systems, exemplified by some protists). How did eukaryotic cells solve the problem of 5S rRNA loss from mitochondrial genomes? One of possible ways, as mentioned above, consists in direct substitution of this RNA with new ribosomal proteins forming the central protuberance (yeast, trypanosomatids) (Sharma et al. 2009; Smirnov et al. 2008a). Still, the obvious existence of cytosolic 5S rRNA import pathway in mammalian cells, as well as recent data discussed below, suggest that in the latter case, the role of the lost component may be performed by its cytosolic ortholog.

5S rRNA targeting into mammalian mitochondria mechanisms were recently described. This pathway includes RNA protein interaction involving at least two cytosolic precursor of mitochondrial proteins, preMRP-L18, and rhodanese and involves, as in the case of yeast tRNA mitochondrial import, structural rearrangements of the imported RNA molecule (Smirnov et al. 2008b, 2010, 2011) (Fig. 4.3). In the context of this chapter, it is worth to note that preMRP-L18 protein belongs to the L5-family of proteins which are direct interactants with 5S rRNAs in all known ribosomes. As a matter of fact, no MRP-L18 homologue was ever found in yeast mitochondria where no 5S rRNA is imported. This fact is to be considered as an indirect evidence on the involvement of the imported

Fig. 4.3 5S rRNA import and cellular translation in mammals. The intracellular distribution of 5S is ruled by a succession of RNA–protein interaction and chaperone events, which withdraw a minor portion of the cytosolic pool of the RNA from the RPL5 dependent nuclear re-export and further cytosolic translation to address it toward mitochondrial matrix where it is hypothesized to become a part of mitochondrial translation machinery



RNA molecule in mitochondrial ribosome, and is not in direct contradiction with the previously described “5S rRNA-less mitoribosome” lacking also many ribosomal proteins described thereafter (Dennerlein et al. 2010; Kolanczyk et al. 2010; Richter et al. 2010; Rorbach et al. 2008; Soleimanpour-Lichaei et al. 2007; Wanschers et al. 2012). Further analysis revealed that, indeed, a sub-population of mitochondrially localized 5S rRNA co-purified with mitochondrial ribosomes, being essentially associated with monosomal fraction, but not with the fraction of the large ribosomal subunit. This result may mean that the association of 5S rRNA with the mitochondrial ribosomes is leaky and the RNA molecule is easily lost upon subunits dissociation, which would explain why it was not previously detected. This idea was also in a good agreement with the fact that inhibition of 5S rRNA import by siRNA-downregulation of targeting factors (either rhodanese or MRP-L18) strongly affected mitochondrial translation (Smirnov et al. 2011). It is clear that additional functional and structural studies are needed to validate the “ribosomal” function of the imported rRNA, but all currently available data are in favor of it. Once more, as in the case of tRNA import in yeast mitochondria, the primary function of the imported RNA seems to be exploited in the organelle, while no evidence for any other alternative function was found.

4.4 Import of RNase P RNA in Mammalians and Mitochondrial Translation

Another case of RNA import that might be indirectly related to mitochondrial translation concerns the RNA component of 5'-end tRNA processing enzyme, RNase P in mammalians. RNases P were long time considered as obligatory containing a ribozyme (Joyce 1989). Since many species (but not all) do not possess corresponding genes in their mitochondrial genomes, it was suggested that they import this 200–300 bases long RNA from the cytosol. In the case of mammalian cells, the first experimental evidence of the presence of RNase P RNA in the mitochondria was reported more than 20 years ago (Doersen et al. 1985), which corroborated with a further study (Puranam and Attardi 2001). So far, the amount of this RNA associated with mitochondria was extremely low, which raised a debate about the existence of the RNase P RNA import pathway, along with that of MRP RNA, a related RNA species [mitochondrial RNA processing (MRP) enzyme RNP complex, proposed to participate in the initiation of mtDNA replication] (Chang and Clayton 1989; Topper et al. 1992). Furthermore, more recently RNA-free (only proteinaceous) mitochondrial RNase P was characterized in several species, including mammalians (Pavlova et al. 2012; Gutmann et al. 2012; Gobert et al. 2010; Holzmann et al. 2008; Rossmanith and Potuschak 2001). This discovery made unclear the role of the tiny amounts of RNase P RNA (H1 RNA) in mammalian mitochondria. So far, another study suggested a new possible function of this RNA. Indeed, RNA import into mammalian mitochondria,

including three RNAs hypothesized to be targeted into the organelle, namely 5S rRNA, MRP RNA, and RNase P (RNA H1), was reported to depend on a protein associated with the inner mitochondrial membrane or intermembrane space, PNPT1 (PNPase, polynucleotide phosphorylase). Inhibition of PNPT1 resulted in a decrease of RNA import. tRNA processing was also analyzed and it was demonstrated that in conditions of PNPT1 downregulation single tRNA genes produced correctly maturated tRNA, while processing of tandem ones was affected. It was then proposed that RNA-containing RNase P may be required only for maturation of the later (Wang et al. 2010). This defect is expected to affect not only the very tRNA maturation (and therefore its functionality in translation), but also mRNA one, since tRNA secondary structures are thought to serve as signals of primary multicistronic transcript cleavage (Ojala et al. 1981). More recently, analysis of a case of pathological mutations in PNPT1 gene (causing a respiratory chain deficiency), demonstrated that when PNPase was reduced, translation in mitochondria was also affected, while overexpression of a wild-type gene fully restored the deficiency (Vedrenne et al. 2012). In the context of this chapter, it is noteworthy to mention that in PNPT1 mutants not only RNA H1 import appears as affected (von Ameln et al. 2012), but also 5S rRNA one (Vedrenne et al. 2012), which may be the main reason for translational deficiency. At this moment, the exact meaning of the H1 RNA presence in mammalian mitochondria is still subject to debate, although coexistence of both RNA-containing and RNA-free RNases P remains a plausible possibility.

4.5 Import of Micro RNAs and Mitochondrial Translation

Several recent studies, essentially systematic ones, have found microRNAs (miRNAs) in mitochondria of liver cells, myoblasts, HeLa cells etc. (Bandiera et al. 2011; Barrey et al. 2011; Bian et al. 2010; Kren et al. 2009). If the question of their origin is still open, at least for some of them nuclear coding and mitochondrial import was hypothesized. The mechanisms of this targeting were still not studied. This type of small noncoding RNA molecules participate usually in regulation of mRNA translation and stability (Fabian et al. 2010). There is still very little information on possible involvement of imported miRNAs in mitochondrial translational regulation. So far, it was already reported that miR-181c miRNA species would be nuclear-encoded, mitochondrially targeted, and regulating mitochondrial cytochrome oxidase (COX) subunit 1 mRNA translation (Das et al. 2012). One can expect that further examples of such regulation may appear in the future. In this context it is also crucial to determine with precision the real origin of these RNAs, since the mitochondrial targeting for molecules having homology with mtDNA is sometimes thorough to prove and requires specific model systems of *in vitro* and *in vivo* import, as it was done for tRNAs or 5S rRNAs for yeast, plant, or mammalian systems. Besides the mechanistic aspect of potential microRNA import into mitochondria, it will also be challenging to identify the exact functions of a given

imported microRNA in mitochondrial translation. Indeed, since in other biological systems they were essentially implicated in cap-dependent translation regulation (Fabian et al. 2010), which is not existing in mitochondria, one can reasonably expect the existence of other, still not discovered mechanisms.

4.6 Import of RNA as a Tool to Correct Dysfunctions in Mitochondrial Translation

Mutations in the mtDNA are an important cause of human diseases, which affect essentially (but not exclusively) the nervous system and the muscles. Diseases associated with deleterious mutations of the mtDNA are often severe neuromuscular disorders, such as for example the syndromes MERRF, MELAS, CPEO, KSS, or LHON. Each of these diseases is to be considered as “rare” (<1:5,000–10,000), but their global socio-medical input is very important and often underestimated. Among the over 350 mtDNA pathogenic mutations characterized to-date in the relatively small human mitochondrial genome (16,569 base pairs), more than 140 are located in tRNA genes, over 70 in protein-coding genes, and a few in the rRNA genes, the rest 120 being deletions of variable size (Ruiz-Pesini et al. 2007). Most of these mutations affect mitochondrial translation, either in specific (one mRNA) or nonspecific (nonfunctional tRNAs or rRNAs) manner. To-date, these diseases do not have efficient curative therapies. The gene therapy approach therefore represents an open possibility, which may be followed in two directions. The first one, commonly referred to as “allotopic expression” (Smith et al. 2004), is to express the gene of interest in the nucleus and to target its product into mitochondria where it would replace its mutant counterpart. The second direction, referred to as “anti-genomic” (Taylor et al. 2001), is to inhibit the replication of mutant mtDNA molecules, thus favoring the replication of wild-type genomes. This approach is based on the heteroplasmy of most deleterious mtDNA mutations, i.e., within each cell mutated mtDNA molecules coexist with wild-type ones. As clinical symptoms are detected only above a relatively high proportion of mutant mtDNA, even partial inhibition of the propagation of mutant versions of mtDNA is expected to permit a significant rescue of mitochondrial functions. Here below we describe how both strategies were experimentally tested by exploiting the RNA mitochondrial pathway, in each case observing improvement of mitochondrial translation affected by mtDNA mutations.

4.6.1 Allotopic Strategy

The first description of successful allotopic strategy using RNA import refers to the yeast model, where a nonsense mutation in mtDNA encoded COX2 subunit was functionally complemented by an engineered mitochondrially targeted

cytosolic tRNA (Kolesnikova et al. 2000). This study, validating the idea of exploiting the RNA import for correction of mtDNA mutations effects, demonstrated that eukaryotic type tRNAs can be functional in mitochondrial translation. A similar approach was further applied to two different pathogenic mutations in human mitochondrial tRNAs genes. The first one concerned a point mutation A8344 > G localized in the tRNA^{Lys} gene, often associated with the MERRF syndrome (Myoclonic Epilepsy with Red Ragged Fibers). In this study (Kolesnikova et al. 2004), we used the fact that human mitochondria are able to import the yeast tRNAs^{Lys} (tRK1, see above) or their mutant derivatives (Entelis et al. 2002, 2001b; Kolesnikova et al. 2002). Several versions of specifically designed importable tRNA versions were indeed shown to partially correct all mitochondrial functions affected by the MERRF mutation. In the context of this chapter, it is noteworthy that this mutation in the tRNA^{Lys} affects modification of the anticodon, which leads to a recognition of AAA or AAG lysine codon with different efficiencies (the last one is less efficiently read) and consecutive abortive or inefficient translation (Kirino et al. 2004; Yasukawa et al. 2001). Mitochondrially targeted cytosolic tRNA^{Lys} was shown to reverse this defect of translation and, as the functional consequence, to improve other mitochondrial functions, both in model immortalized cybrid cells or in patient derived primary fibroblasts (Kolesnikova et al. 2004).

The second, more recent successful attempt to apply allotopic strategy using RNA import concerns another point mutation in the mitochondrial tRNA^{Leu} gene, A3243 > G, causing the MELAS disease (Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis, Stroke-like episodes). In this case no naturally imported tRNA^{Leu} was available neither in human nor in yeast cells, so a set of chimeric tRNAs with switched aminoacylation identity was created based on tRK importable versions. It was found that introduction of leucinylation identity elements [essentially localized in the anticodon (Giegé et al. 1998)] in the context of yeast cytosolic tRNAs^{Lys} did not affect their capacity to be mitochondrially targeted into yeast, but more important, also into human mitochondria. It was then demonstrated that the imported recombinant tRNA was able to be correctly aminoacylated by the Leucine (either in the cytosol or in the organelle) and to participate in mitochondrial translation. Transient or stable expression of the importable tRNA in model cybrid cells bearing the MELAS mutation lead to a significant rescue of mitochondrial translation, and consequently other mitochondrial functions (respiration, electron transfer complexes activity, etc.) (Karicheva et al. 2011).

Several alternative strategies, but which also can be termed as “allotopic”, were developed by another team, studying the RNA mitochondrial import mechanisms in a trypanosomatid *Leishmania tropica*. An important part of the results of this team (Goswami et al. 2006) were subject of controversy which is still not resolved (Schekman 2010), therefore we shall not discuss here the mechanistic aspects of this pathway, but in the context of the current chapter, it would be worthy to mention recent development of this study leading to propose a therapeutic use of RNA import. All these studies exploit the mitochondrial inner membrane anchored RIC (RNA Import Complex) to deliver RNAs with therapeutic capacities into mitochondria (Adhya 2008). If RIC was described as facilitating tRNA delivery

into *Leishmania* mitochondria, it was also proposed that it can be internalized by cultured human cells in a caveolin-1-dependent manner and to be then inserted in human mitochondrial membranes (Mahata et al. 2006). This insertion was described to promote import of cytosolic tRNAs into human mitochondria, which permitted to complement translation defects caused either point mtDNA mutation in either tRNA^{Lys} (MERRF) or 2 kb deletion (KSS, Kearns-Seyre syndrome). A related method was more recently used to address *any* type of mtDNA mutation, comprising single and multiple deletions, or even more generally many types of mitochondrial dysfunction, as altered ROS production. To this end the RIC reconstituted from recombinant proteins was complexed with synthetic transcripts covering significant or all coding portions of mammalian mtDNA, by introducing into these transcripts a previously identified “import signature” (a short hairpin structure present in all imported *Leishmania* tRNAs), and addressing it into affected cells or tissues (Jash and Adhya 2011, 2012; Mahata et al. 2011; Jash et al. 2011).

A recent development of allotopic strategy described exploited the newly identified RNA import mitochondrial factor, PNPT1 (PNPase, polynucleotide phosphorylase). This inner membrane localized protein was formerly shown to be the part of RNA mitochondrial delivery machinery and its specificity relayed to recognition of a conserved hairpin structure in the imported H1 RNA molecule (Wang et al. 2010). This “import signature”, referred to as RP sequence, was fused to either tRNA^{Lys} or tRNA^{Leu} expressed in nucleus, which promoted their import into human mitochondria and corrected in a significant manner translation defects due to MERRF or MELAS mutations, correspondingly (Wang et al. 2012) (Fig. 4.4). As a matter of fact, the same RP import signature permitted to address into mitochondria much larger RNA molecules in the PNPase-dependent manner, like COX2 mRNA expressed in the nucleus (Wang et al. 2012).

Allotopic strategy can also be imagined by using the artificially induced protein-driven RNA import, which is not strictly corresponding to the natural RNA import pathway focused in the chapter, still being worth to be mentioned here. Indeed, covalent (Seibel et al. 1995; Vestweber and Schatz 1989) or noncovalent (Sieber et al. 2011b) complexing of nucleic acids with mitochondrially imported proteins or even peptides can promote their co-internalization into the organelles, and thus can be used for mitochondrial addressing functionally active molecules, as tRNAs, or even mRNAs, into mitochondria bearing pathogenic mutations.

4.6.2 Antigenomic Strategy

Reducing the heteroplasmy level of mtDNA mutations below the pathogenic threshold was attempted by many strategies, including addressing into mitochondria peptide nucleic acids (PNAs), specific restriction enzymes, using mitochondrial substrates and, on the level of the organism, specific diets (reviewed in Smith and Lightowlers 2010; Smith et al. 2004), all of these approaches are valuable but still have many technical limitations. The first validation of RNA import as a tool for

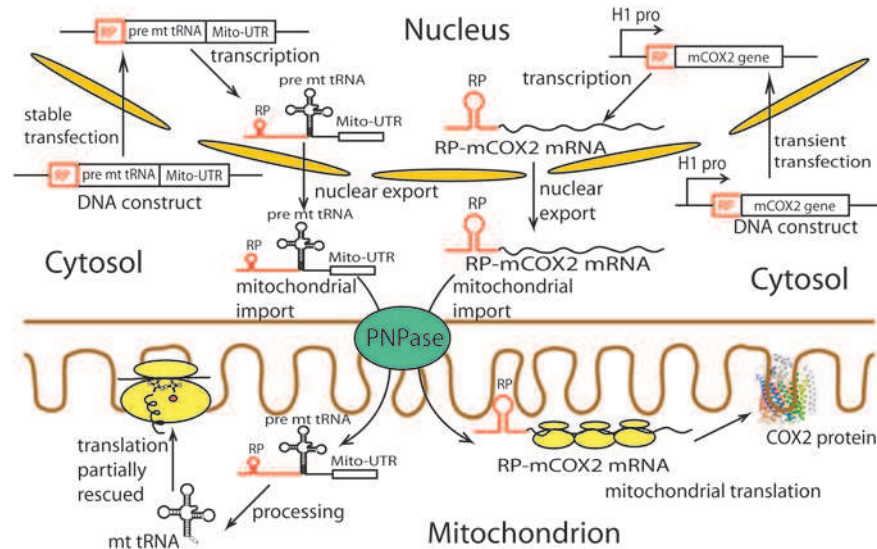


Fig. 4.4 Two allotropic gene therapy models exploiting *PNPase*-promoted RNA import. At the *left* side is schematically presented the tRNA import into human mitochondria, which permits complementation of tRNA mutations in mtDNA (MERRF, MELAS). RP, RNA import signature of RNase P H1 RNA fused to the pre-tRNA, which targets the RNA into mitochondrial. At the *right* side—a similar approach but when RP sequence was fused to an mRNA (COX2 respiratory subunit)

antigenomic strategy was recently described by our team (Comte et al. 2013), the model concerned a large 8 kb long deletion from base 8363 to 15438 and including several structural genes and 6 tRNA ones. This heteroplasmic deletion provokes the KSS disease and is characterized by a significant, though not very dramatic, changes in mitochondrial translation pattern, which may be explained by a 2–3 lower copy number of the genes localized within the deletion. The rationale of the approach was to target mitochondria with short oligoribonucleotides complementary to the new sequence generated by the mutation which could affect replication of only mutant mtDNA molecule. Two types of RNA molecules were used as vectors to address “therapeutic” oligoribonucleotides into mitochondria; the first one was based on 5S rRNA, where the so-called β -domain, dispensable for mitochondrial targeting (Smirnov et al. 2008b), was replaced by the oligonucleotides corresponding to either the H- or L-strands of mtDNA region surrounding the deletion (Fig. 4.5). The second RNA-vector was based on mini-RNAs resulting from SELEX experiments held on importable tRNA sequences, which represent a simple two-hairpin structures where the linker can be replaced by oligonucleotides of interest (Kolesnikova et al. 2010). It was demonstrated that both types of chimeric RNA molecules were addressed into mitochondria of cultured human cells and that their import was accompanied by a reproducible decrease of the ratio between mutant and wild-type mtDNA. This shift of heteroplasmy (transient in the case of transient transfection and stable when

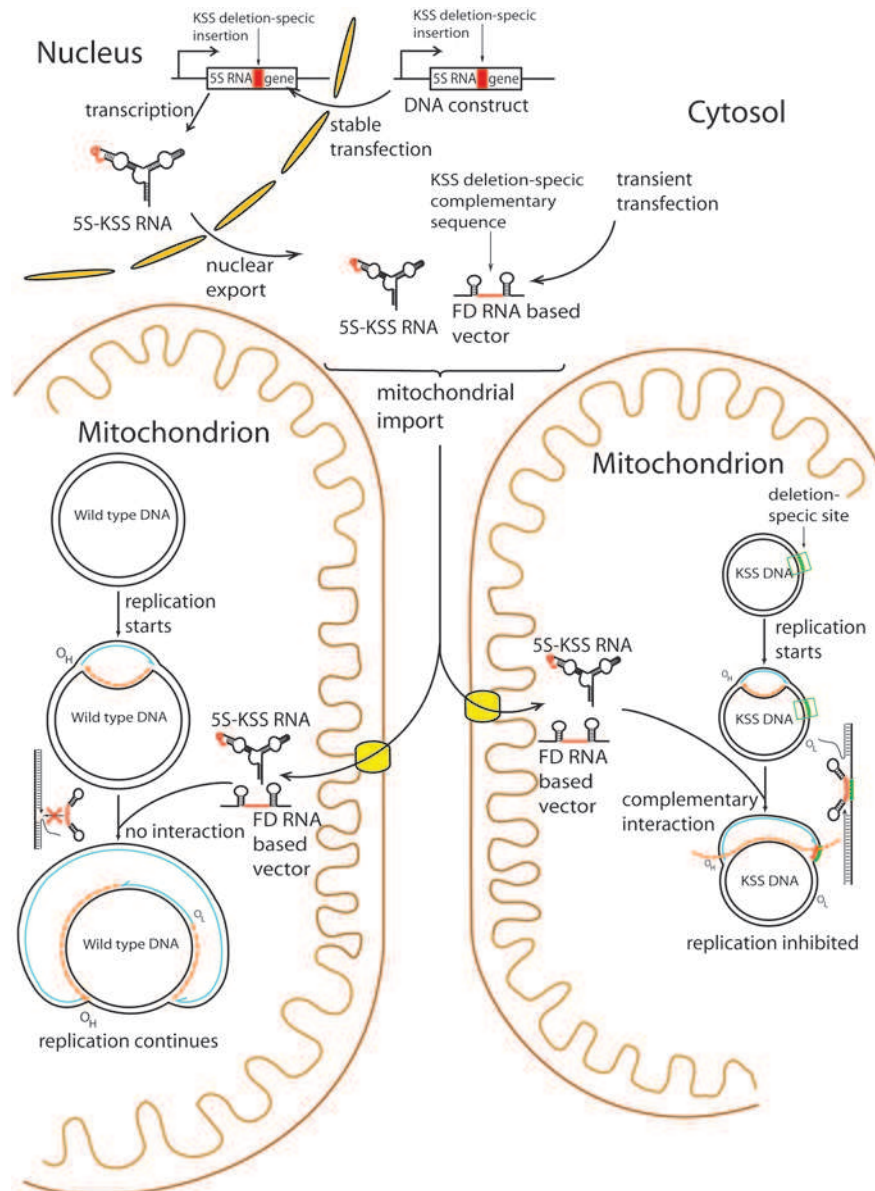


Fig. 4.5 Antigenomic gene therapy models exploiting RNA mitochondrial import. In both cases, a large deletion associated with the KSS disease was addressed. At the *upper left* side—the use of natural import of 5S rRNA, whose recombinant versions were stably expressed in cybrid cells. The antigenomic oligonucleotide replacing the 5S rRNA β -domain is in *red*. At the *upper right* side—FD short tRNA derivatives were used for transient transfection of cybrid cells. At the *bottom*, the schema illustrates the specificity of anti-replication effect of the recombinant mitochondrially targeted RNAs: no effect on wild-type mtDNA replication (*left*) and inhibition of KSS mutant mtDNA (*right*)

recombinant RNAs were stably expressed) resulted in a restoration of a normal mitochondrial translation patterns, thus producing a curative effect (Comte et al. 2013).

4.7 Concluding Remarks

To summarize the main issues of this chapter, one can remark that RNA targeting into mitochondria is, in the majority of studied cases, intimately linked to mitochondrial translation, either in direct (tRNAs, rRNA) or nondirect (regulation of translation by miRNA) manner. As it was stressed many times (Sieber et al. 2011a; Schneider 2011; Rubio and Hopper 2011; Salinas et al. 2008), RNA import, even sharing a number of common features among species, still is considered as emerged many times upon evolution. One can suggest that innate capacity of mitochondria to import short RNAs was used to either complement or to optimize the organellar biosynthetic apparatus. It is interesting to note that if the proteins participating in this pathway vary enormously among species and often are “moonlighting” (performing their secondary jobs, i.e., enolase, aminoacyl-tRNA synthetases, rhodanese, ribosomal protein MRP-L18, PNPase, etc.), each time when the imported RNA function inside the organelle was investigated in details, it was rather a classical one in translation (tRNA, 5S rRNA) and not alternative. The functionality of these imported molecules and the flexibility of the overall process make the RNA import pathway an extremely promising tool for the future gene therapy of mitochondrial pathologies, and the first model systems described here above are well illustrating this idea. Indeed, RNA mitochondrial import might be altered in order to either send in the organelles fully functional translation-related molecules to replace the mutant ones or to promote a reduction of mutant mtDNA to correct translation defects.

Acknowledgments The authors thank all the members of the UMR 7156 GMGM mitochondrial team (Strasbourg, France), H. Becker (Strasbourg, France), R. N. Lightowers (Newcastle, U.K.), and J. Herrmann (Kaiserslautern, Germany) for helpful discussions. The studies of our team cited in the chapter were supported by the CNRS, University of Strasbourg, ANR (Agence Nationale de Recherche), AFM (Association Française contre les Myopathies), FRM (Fondation de Recherche Médicale), and the National Program Investissement d’Avenir (LabEx MitoCross).

IC and PK are supported by Russian Foundation for Basic Research and Russian Ministry of Education and Science (Federal programme “Scientific stuff of innovative Russia”).

References

- Adhya S (2008) Leishmania mitochondrial tRNA importers. *Int J Biochem Cell Biol* 40(12):2681–2685
- Agris PF, Vendeix FA, Graham WD (2007) tRNA’s wobble decoding of the genome: 40 years of modification. *J Mol Biol* 366(1):1–13
- Bandiera S, Ruberg S, Girard M, Cagnard N, Hanein S, Chretien D, Munnich A, Lyonnet S, Henrion-Caude A (2011) Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria. *PLoS ONE* 6(6):e20746

- Barrey E, Saint-Auret G, Bonnamy B, Damas D, Boyer O, Gidrol X (2011) Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PLoS ONE* 6(5):e20220
- Bian Z, Li LM, Tang R, Hou DX, Chen X, Zhang CY, Zen K (2010) Identification of mouse liver mitochondria-associated miRNAs and their potential biological functions. *Cell Res* 20(9):1076–1078
- Brandina I, Smirnov A, Kolesnikova O, Entelis N, Krasheninnikov IA, Martin RP, Tarassov I (2007) tRNA import into yeast mitochondria is regulated by the ubiquitin-proteasome system. *FEBS Lett* 581(22):4248–4254
- Chang DD, Clayton DA (1989) Mouse RNAase MRP RNA is encoded by a nuclear gene and contains a decamer sequence complementary to a conserved region of mitochondrial RNA substrate. *Cell* 56(1):131–139
- Charriere F, Tan TH, Schneider A (2005) Mitochondrial initiation factor 2 of *Trypanosoma brucei* binds imported formylated elongator-type tRNA(Met). *J Biol Chem* 280(16):15659–15665
- Comte C, Tonin Y, Heckel-Mager AM, Boucheham A, Smirnov A, Aure K, Lombes A, Martin RP, Entelis N, Tarassov I (2013) Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome. *Nucleic Acids Res* 41(1):418–433
- Das S, Ferlito M, Kent OA, Fox-Talbot K, Wang R, Liu D, Raghavachari N, Yang Y, Wheelan SJ, Murphy E, Steenbergen C (2012) Nuclear miRNA regulates the mitochondrial genome in the heart. *Circ Res* 110(12):1596–1603
- Dennerlein S, Rozanska A, Wydro M, Chrzanoska-Lightowlers ZM, Lightowlers RN (2010) Human ERAL1 is a mitochondrial RNA chaperone involved in the assembly of the 28S small mitochondrial ribosomal subunit. *Biochem J* 430(3):551–558
- Dietrich A, Weil JH, Marechal-Drouard L (1992) Nuclear-encoded transfer RNAs in plant mitochondria. *Annu Rev Cell Biol* 8:115–131
- Dietrich A, Marechal-Drouard L, Carneiro V, Cosset A, Small I (1996) A single base change prevents import of cytosolic tRNA(Ala) into mitochondria in transgenic plants. *Plant J* 10(5):913–918
- Doersen CJ, Guerrier-Takada C, Altman S, Attardi G (1985) Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity. *J Biol Chem* 260(10):5942–5949
- Enriquez JA, Attardi G (1996a) Analysis of aminoacylation of human mitochondrial tRNAs. *Methods Enzymol* 264:183–196
- Enriquez JA, Attardi G (1996b) Evidence for aminoacylation-induced conformational changes in human mitochondrial tRNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(16):8300–8305
- Enriquez JA, Perez-Martos A, Lopez-Perez MJ, Montoya J (1996) In organello RNA synthesis system from mammalian liver and brain. *Methods Enzymol* 264:50–57
- Entelis NS, Kolesnikova OA, Dogan S, Martin RP, Tarassov IA (2001a) 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *J Biol Chem* 276(49):45642–45653
- Entelis NS, Kolesnikova OA, Dogan S, Martin RP, Tarassov IA (2001b) 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *J Biol Chem* 276(49):45642–45653
- Entelis NS, Kolesnikova OA, Martin RP, Tarassov IA (2001c) RNA delivery into mitochondria. *Adv Drug Deliv Rev* 49(1–2):199–215
- Entelis N, Kolesnikova O, Kazakova H, Brandina I, Kamenski P, Martin RP, Tarassov I (2002) Import of nuclear encoded RNAs into yeast and human mitochondria: experimental approaches and possible biomedical applications. *Genet Eng (N Y)* 24:191–213
- Entelis N, Brandina I, Kamenski P, Krasheninnikov IA, Martin RP, Tarassov I (2006) A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 20:1609–1620
- Fabian MR, Sonenberg N, Filipowicz W (2010) Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs. *Annu Rev Biochem* 79:351–379
- Feng L, Sheppard K, Tumbula-Hansen D, Soll D (2005) Gln-tRNA^{Gln} formation from Glu-tRNA^{Gln} requires cooperation of an asparaginase and a Glu-tRNA^{Gln} kinase. *J Biol Chem* 280(9):8150–8155

- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 440(3):325–331
- Frechin M, Senger B, Braye M, Kern D, Martin RP, Becker HD (2009) Yeast mitochondrial Glu-tRNA(Gln) is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. *Genes Dev* 23(9):1119–1130
- Geslain R, Aeby E, Guitart T, Jones TE, Castro de Moura M, Charriere F, Schneider A, Ribas de Pouplana L (2006) Trypanosoma seryl-tRNA synthetase is a metazoan-like enzyme with high affinity for tRNA^{Sec}. *J Biol Chem* 281(50):38217–38225
- Giegé R, Sissler M, Florentz C (1998) Universal rules and idiosyncratic features in tRNA identity. *Nucleic Acids Res* 26:5017–5035
- Gobert A, Gutmann B, Taschner A, Gossringer M, Holzmann J, Hartmann RK, Rossmannith W, Giege P (2010) A single Arabidopsis organellar protein has RNase P activity. *Nat Struct Mol Biol* 17(6):740–744
- Goswami S, Dhar G, Mukherjee S, Mahata B, Chatterjee S, Home P, Adhya S (2006) A bifunctional tRNA import receptor from *Leishmania* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(22):8354–8359
- Gutmann B, Gobert A, Giege P (2012) PRORP proteins support RNase P activity in both organelles and the nucleus in *Arabidopsis*. *Genes Dev* 26(10):1022–1027
- Hauser R, Schneider A (1995) tRNAs are imported into mitochondria of *Trypanosoma brucei* independently of their genomic context and genetic origin. *EMBO J* 14(17):4212–4220
- Holzmann J, Frank P, Löffler E, Bennett KL, Gerner C, Rossmannith W (2008) RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* 135(3):462–474
- Ibba M, Soll D (2004) Aminoacyl-tRNAs: setting the limits of the genetic code. *Genes Dev* 18(7):731–738
- Jash S, Adhya S (2011) Suppression of reactive oxygen species in cells with multiple mitochondrial DNA deletions by exogenous protein-coding RNAs. *Mitochondrion* 11(4):607–614
- Jash S, Adhya S (2012) Induction of muscle regeneration by RNA-mediated mitochondrial restoration. *FASEB J* 26(10):4187–4197
- Jash S, Chowdhury T, Adhya S (2011) Modulation of mitochondrial respiratory capacity by carrier-mediated transfer of RNA in vivo. *Mitochondrion* 12(2):262–270
- Joyce GF (1989) RNA evolution and the origins of life. *Nature* 338(6212):217–224
- Kamenski P, Kolesnikova O, Jubent V, Entelis N, Krashennnikov IA, Martin RP, Tarassov I (2007a) Evidence for an adaptation mechanism of mitochondrial translation via tRNA import from the cytosol. *Mol Cell* 26(5):625–637
- Kamenski P, Vinogradova E, Krashennnikov I, Tarassov I (2007b) Directed import of macromolecules into mitochondria. *Mol Biol* 41:187–202
- Karicheva OZ, Kolesnikova OA, Schirtz T, Vysokikh MY, Mager-Heckel AM, Lombes A, Boucheham A, Krashennnikov IA, Martin RP, Entelis N, Tarassov I (2011) Correction of the consequences of mitochondrial 3243A > G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria. *Nucleic Acids Res* 39(18):8173–8186
- Kiparisov S, Petrov A, Meskauskas A, Sergiev PV, Dontsova OA, Dinman JD (2005) Structural and functional analysis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* 274(3):235–247
- Kirino Y, Yasukawa T, Ohta S, Akira S, Ishihara K, Watanabe K, Suzuki T (2004) Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(42):15070–15075
- Kolanczyk M, Pech M, Zemojtel T, Yamamoto H, Mikula I, Calvaruso MA, van den Brand M, Richter R, Fischer B, Ritz A, Kossler N, Thurisch B, Spoerle R, Smeitink J, Kornak U, Chan D, Vingron M, Martasek P, Lightowlers RN, Nijtmans L, Schuelke M, Nierhaus KH, Mundlos S (2010) NOA1 is an essential GTPase required for mitochondrial protein synthesis. *Mol Biol Cell* 22(1):1–11
- Kolesnikova OA, Entelis NS, Mireau H, Fox TD, Martin RP, Tarassov IA (2000) Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science* 289(5486):1931–1933

- Kolesnikova O, Entelis N, Kazakova H, Brandina I, Martin RP, Tarassov I (2002) Targeting of tRNA into yeast and human mitochondria: the role of anticodon nucleotides. *Mitochondrion* 2(1–2):95–107
- Kolesnikova OA, Entelis NS, Jacquin-Becker C, Goltzene F, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Lightowlers RN, Martin RP, Tarassov I (2004) Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum Mol Genet* 13(20):2519–2534
- Kolesnikova O, Kazakova H, Comte C, Steinberg S, Kamenski P, Martin RP, Tarassov I, Entelis N (2010) Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria. *RNA* 16(5):926–941
- Kouvela EC, Gerbanas GV, Xaplanteri MA, Petropoulos AD, Dinos GP, Kalpaxis DL (2007) Changes in the conformation of 5S rRNA cause alterations in principal functions of the ribosomal nanomachine. *Nucleic Acids Res* 35(15):5108–5119
- Kren BT, Wong PY, Sarver A, Zhang X, Zeng Y, Steer CJ (2009) MicroRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis. *RNA Biol* 6(1):65–72
- Kumar R, Marechal-Drouard L, Akama K, Small I (1996) Striking differences in mitochondrial rRNA import between different plant species. *Mol Gen Genet* 252(4):404–411
- Kurata S, Weixlbaumer A, Ohtsuki T, Shimazaki T, Wada T, Kirino Y, Takai K, Watanabe K, Ramakrishnan V, Suzuki T (2008) Modified uridines with C5-methylene substituents at the first position of the tRNA anticodon stabilize U.G wobble pairing during decoding. *J Biol Chem* 283(27):18801–18811
- Magalhaes PJ, Andreu AL, Schon EA (1998) Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria. *Mol Biol Cell* 9(9):2375–2382
- Mahata B, Mukherjee S, Mishra S, Bandyopadhyay A, Adhya S (2006) Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells. *Science* 314(5798):471–474
- Mahato B, Jash S, Adhya S (2011) RNA-mediated restoration of mitochondrial function in cells harboring a Kearns Sayre Syndrome mutation. *Mitochondrion* 11(4):564–574
- Martin R, Schneller JM, Stahl A, Dirheimer G (1979) Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria. *Biochemistry* 18:4600–4605
- Mercer TR, Neph S, Dinger ME, Crawford J, Smith MA, Shearwood AM, Haugen E, Bracken CP, Rackham O, Stamatoyannopoulos JA, Filipovska A, Mattick JS (2011) The human mitochondrial transcriptome. *Cell* 146(4):645–658
- Nagao A, Suzuki T, Katoh T, Sakaguchi Y (2009) Biogenesis of glutaminyl-mt tRNAGln in human mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(38):16209–16214
- Ojala D, Montoya J, Attardi G (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* 290(5806):470–474
- Pavlova LV, Gossringer M, Weber C, Buzet A, Rossmanith W, Hartmann RK (2012) tRNA processing by protein-only versus RNA-based RNase P: kinetic analysis reveals mechanistic differences. *ChemBioChem* 13(15):2270–2276
- Puranam RS, Attardi G (2001) The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Mol Cell Biol* 21(2):548–561
- Richter R, Rorbach J, Pajak A, Smith PM, Wessels HJ, Huynen MA, Smeitink JA, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM (2010) A functional peptidyl-tRNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome. *EMBO J* 29(6):1116–1125
- Rinehart J, Krett B, Rubio MA, Alfonzo JD, Soll D (2005) *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev* 19(5):583–592
- Rorbach J, Richter R, Wessels HJ, Wydro M, Pekalski M, Farhoud M, Kuhl I, Gaisne M, Bonnefoy N, Smeitink JA, Lightowlers RN, Chrzanowska-Lightowlers ZM (2008) The human mitochondrial ribosome recycling factor is essential for cell viability. *Nucleic Acids Res* 36(18):5787–5799

- Rossmann W, Potuschak T (2001) Difference between mitochondrial RNase P and nuclear RNase P. *Mol Cell Biol* 21(23):8236–8237
- Rubio MA, Hopper AK (2011) Transfer RNA travels from the cytoplasm to organelles. *Wiley Interdiscip Rev RNA* 2(6):802–817
- Rubio MA, Liu X, Yuzawa H, Alfonzo JD, Simpson L (2000) Selective importation of RNA into isolated mitochondria from *Leishmania tarentolae*. *RNA* 6(7):988–1003
- Rubio MA, Rinehart JJ, Krett B, Duvezin-Caubet S, Reichert AS, Soll D, Alfonzo JD (2008) Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(27):9186–9191
- Ruiz-Pesini E, Lott MT, Procaccio V, Poole JC, Brandon MC, Mishmar D, Yi C, Kreuziger J, Baldi P, Wallace DC (2007) An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res* 35(Database issue):D823–D828
- Salinas T, Duchene AM, Delage L, Nilsson S, Glaser E, Zaepfel M, Marechal-Drouard L (2006) The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103(48):18362–18367
- Salinas T, Duchene AM, Marechal-Drouard L (2008) Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends Biochem Sci* 33(7):320–329
- Schekman R (2010) Editorial expression of concern: a bifunctional tRNA import receptor from *Leishmania* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:9476
- Schneider A (1994) Import of RNA into mitochondria. *Trends Cell Biol* 4:282–286
- Schneider A (2011) Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation. *Annu Rev Biochem* 80:1033–1053
- Schneider A, Marechal-Drouard L (2000) Mitochondrial tRNA import: are there distinct mechanisms? *Trends Cell Biol* 10(12):509–513
- Seibel P, Trappe J, Villani G, Klopstock T, Papa S, Reichmann H (1995) Transfection of mitochondria: strategy towards a gene therapy of mitochondrial DNA diseases. *Nucleic Acids Res* 23(1):10–17
- Sharma MR, Koc EC, Datta PP, Booth TM, Spremulli LL, Agrawal RK (2003) Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell* 115(1):97–108
- Sharma MR, Booth TM, Simpson L, Maslov DA, Agrawal RK (2009) Structure of a mitochondrial ribosome with minimal RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(24):9637–9642
- Sieber F, Duchene AM, Marechal-Drouard L (2011a) Mitochondrial RNA import: from diversity of natural mechanisms to potential applications. *Int Rev Cell Mol Biol* 287:145–190
- Sieber F, Placido A, El Farouk-Ameqrane S, Duchene AM, Marechal-Drouard L (2011b) A protein shuttle system to target RNA into mitochondria. *Nucleic Acids Res* 39(14):e96
- Simpson AM, Suyama Y, Dewes H, Campbell DA, Simpson L (1989) Kinetoplastid mitochondria contain functional tRNAs which are encoded in nuclear DNA and also contain small minicircle and maxicircle transcripts of unknown function. *Nucleic Acids Res* 17(14):5427–5445
- Small I, Marechal-Drouard L, Masson J, Pelletier G, Cosset A, Weil JH, Dietrich A (1992) In vivo import of a normal or mutagenized heterologous transfer RNA into the mitochondria of transgenic plants: towards novel ways of influencing mitochondrial gene expression? *EMBO J* 11(4):1291–1296
- Smirnov A, Entelis N, Krasheninnikov I, P. MR, Tarassov I (2008a) 5S rRNA: peculiarities of structure, interactions with macromolecules and possible functions. *Progress in Biological Chemistry (Russian, translated in English)*
- Smirnov A, Tarassov I, Mager-Heckel AM, Letzelter M, Martin RP, Krasheninnikov IA, Entelis N (2008) Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria. *RNA* 14(4):749–759
- Smirnov A, Comte C, Mager-Heckel AM, Addis V, Krasheninnikov IA, Martin RP, Entelis N, Tarassov I (2010) Mitochondrial enzyme rhodanese is essential for 5 S ribosomal RNA import into human mitochondria. *J Biol Chem* 285(40):30792–30803

- Smirnov A, Entelis N, Martin RP, Tarassov I (2011) Biological significance of 5S rRNA import into human mitochondria: role of ribosomal protein MRP-L18. *Genes Dev* 25(12):1289–1305
- Smith PM, Lightowlers RN (2010) Altering the balance between healthy and mutated mitochondrial DNA. *J Inher Metab Dis* 34(2):309–313
- Smith MW, Meskauskas A, Wang P, Sergiev PV, Dinman JD (2001) Saturation mutagenesis of 5S rRNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21(24):8264–8275
- Smith PM, Ross GF, Taylor RW, Turnbull DM, Lightowlers RN (2004) Strategies for treating disorders of the mitochondrial genome. *Biochim Biophys Acta* 1659(2–3):232–239
- Smits P, Smeitink JA, van den Heuvel LP, Huynen MA, Ettema TJ (2007) Reconstructing the evolution of the mitochondrial ribosomal proteome. *Nucleic Acids Res* 35(14):4686–4703
- Smits P, Smeitink J, van den Heuvel L (2010) Mitochondrial translation and beyond: processes implicated in combined oxidative phosphorylation deficiencies. *J Biomed Biotechnol* 2010:737385
- Soleimanpour-Lichaei HR, Kuhl I, Gaisne M, Passos JF, Wydro M, Rorbach J, Temperley R, Bonnefoy N, Tate W, Lightowlers R, Chrzanoska-Lightowlers Z (2007) mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG. *Mol Cell* 27(5):745–757
- Sprinzel M, Vassilenko KS (2005) Compilation of tRNA sequences and sequences of tRNA genes. *Nucleic Acids Res* 33(Database issue):D139–D140
- Tan TH, Bochud-Allemann N, Horn EK, Schneider A (2002a) Eukaryotic-type elongator tRNAMet of *Trypanosoma brucei* becomes formylated after import into mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(3):1152–1157
- Tan TH, Pach R, Crausaz A, Ivens A, Schneider A (2002b) tRNAs in *Trypanosoma brucei*: genomic organization, expression, and mitochondrial import. *Mol Cell Biol* 22(11):3707–3717
- Tarassov I, Entelis N, Martin R (1995) Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *EMBO J* 14:3461–3471
- Tarassov I, Kamenski P, Kolesnikova O, Karicheva O, Martin RP, Krasheninnikov IA, Entelis N (2007) Import of nuclear DNA-encoded RNAs into mitochondria and mitochondrial translation. *Cell Cycle* 6(20):2473–2477
- Taylor RW, Wardell TM, Smith PM, Muratovska A, Murphy MP, Turnbull DM, Lightowlers RN (2001) An antigenomic strategy for treating heteroplasmic mtDNA disorders. *Adv Drug Deliv Rev* 49(1–2):121–125
- Topper JN, Bennett JL, Clayton DA (1992) A role for RNAase MRP in mitochondrial RNA processing. *Cell* 70(1):16–20
- Umeda N, Suzuki T, Yukawa M, Ohya Y, Shindo H, Watanabe K (2005) Mitochondria-specific RNA-modifying Enzymes responsible for the biosynthesis of the wobble base in mitochondrial tRNAs. Implications for the molecular pathogenesis of human mitochondrial diseases. *J Biol Chem* 280(2):1613–1624
- Vedrenne V, Gowher A, De Lonlay P, Nitschke P, Serre V, Boddaert N, Altuzarra C, Mager-Heckel AM, Chretien F, Entelis N, Munnich A, Tarassov I, Rotig A (2012) Mutation in PNPT1, which encodes a polyribonucleotide nucleotidyltransferase, impairs RNA import into mitochondria and causes respiratory-chain deficiency. *Am J Hum Genet* 91(5):912–918
- Vestweber D, Schatz G (1989) DNA-protein conjugates can enter mitochondria via the protein import pathway. *Nature* 338(6211):170–172
- Vinogradova E, Salinas T, Cognat V, Remacle C, Marechal-Drouard L (2009) Steady-state levels of imported tRNAs in *Chlamydomonas* mitochondria are correlated with both cytosolic and mitochondrial codon usages. *Nucleic Acids Res* 37(5):1521–1528
- von Ameln S, Wang G, Boulouiz R, Rutherford MA, Smith GM, Li Y, Pogoda HM, Nurnberg G, Stiller B, Volk AE, Borck G, Hong JS, Goodyear RJ, Abidi O, Nurnberg P, Hofmann K, Richardson GP, Hammerschmidt M, Moser T, Wollnik B, Koehler CM, Teitell MA, Barakat

- A, Kubisch C (2012) A mutation in PNPT1, encoding mitochondrial-RNA-import protein PNPase, causes hereditary hearing loss. *Am J Hum Genet* 91(5):919–927
- Wang G, Chen HW, Oktay Y, Zhang J, Allen EL, Smith GM, Fan KC, Hong JS, French SW, McCaffery JM, Lightowers RN, Morse HC 3rd, Koehler CM, Teitell MA (2010) PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell* 142(3):456–467
- Wang G, Shimada E, Zhang J, Hong JS, Smith GM, Teitell MA, Koehler CM (2012) Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(13):4840–4845
- Wanschers BF, Szklarczyk R, Pajak A, van den Brand MA, Gloerich J, Rodenburg RJ, Lightowers RN, Nijtmans LG, Huynen MA (2012) C7orf30 specifically associates with the large subunit of the mitochondrial ribosome and is involved in translation. *Nucleic Acids Res* 40(9):4040–4051
- Yasukawa T, Suzuki T, Ishii N, Ohta S, Watanabe K (2001) Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J* 20(17):4794–4802
- Yokoyama S, Nishimura S (1995) Modified nucleosides and codon recognition. In: RajBhandary U, Söll D (eds) *tRNA: structure, biosynthesis and function*. American Society for Microbiology Press, Washington, DC, pp 207–233
- Yoshionari S, Koike T, Yokogawa T, Nishikawa K, Ueda T, Miura K, Watanabe K (1994) Existence of nuclear-encoded 5S-rRNA in bovine mitochondria. *FEBS Lett* 338(2):137–142

RESULTATS & DISCUSSION

**« Je déteste les discussions,
elles vous font parfois changer d'avis »**

Oscar Wilde

Projet de thèse

Mon projet de thèse s'inscrit dans l'axe thérapeutique que nous développons au laboratoire et qui vise à tirer parti du système d'import des ARN dans les mitochondries. Le but de ces travaux est de développer de nouveaux modèles de thérapie génique s'appuyant sur cette voie naturelle d'adressage des ARN pour tenter d'enrayer les maladies mitochondriales, et également lever les obstacles qui empêchaient jusqu'à présent l'introduction de molécules artificielles à but thérapeutique dans ces organites. Pour ce faire, mon travail s'appuie sur de précédents travaux menés au laboratoire et qui ont conduit à la création de petits ARN artificiels, vecteur servant à l'adressage de séquence au potentiel anti-réplicatif au sein des mitochondries. La première cible de ces ARN fut une large délétion associée à un syndrome pathogénique (syndrome KSS) pour laquelle une diminution du taux d'hétéroplasmie de l'ordre de 30% a été obtenue. C'est à partir de ce point que j'ai contribué à la mise au point de cette stratégie dite anti-génomique. Mes objectifs ont été les suivants :

- (i) démontrer l'impact de ces ARN recombinants sur le mécanisme de réplication par la mise au point de techniques permettant la visualisation et l'analyse des intermédiaires de réplication par électrophorèse bidimensionnelle.
- (ii) optimiser les effets observés sur la délétion KSS par le développement de molécules modifiées portant des groupements chimiques permettant d'accroître leur stabilité au sein de la cellule ainsi que leur interaction avec l'ADNmt mutant.
- (iii) étendre la stratégie anti-génomique à des mutations ponctuelles localisées à différents endroits dans l'ADNmt et également associées à des mutations pathogéniques.

I. Mise en évidence des arrêts de la réplication

1. Modélisation de la stratégie anti-génomique vis-à-vis d'une large délétion associée au syndrome Kearns-Sayre

Amorcée avant ma venue au laboratoire, la stratégie anti-génomique que je vais résumer dans le présent chapitre est essentiellement l'œuvre du Dr Caroline Comte avec qui je signe en tant que premier auteur l'**Article n°2** présenté à la suite de ce chapitre, et qui au cours de son travail de thèse a réussi à mettre en évidence la possibilité de développer une stratégie anti-génomique à l'égard d'une grande délétion.

1.1 Modèle d'étude

Pour notre étude, le modèle sur lequel nous avons tout d'abord concentré notre attention est une large délétion de plus de 7kb (7075 pb exactement), reliée à un syndrome pathologique : le syndrome de Kearns Sayre (ou syndrome KSS). Le tableau clinique de ce type d'affections neuromusculaires est assez étendu et débute généralement avec l'apparition de symptômes oculaires cardinaux associés par la suite à différentes atteintes qui dépendent de la diffusion tissulaire des délétions de l'ADN mitochondrial. Dans le cas présent, cette délétion caractérisée au laboratoire d'Anne Lombès (CRICM, Paris) avec qui nous collaborons étroitement, a été détectée chez un patient d'une quinzaine d'années atteint d'ophtalmoplégie, d'un ptôsis, d'une surdité légère et de difficultés à se déplacer et ce dès l'âge de 9 ans, la nature de cette maladie rendant son évolution progressive. Rappelons que cette délétion est hétéroplasmique et que l'apparition des symptômes dépend d'un niveau, propre au tissu affecté, établit ici à 72% dans les cellules musculaires prélevées lors de la biopsie. L'examen physique révéla également une légère atteinte cérébrale (ataxie) ainsi qu'une faiblesse musculaire liée à une amyotrophie. D'un point de vue morphologique, le muscle squelettique est formé de fibres ayant une prolifération mitochondriale importante ainsi qu'un déficit de l'activité du complexe IV.

En pratique, l'ensemble de nos expérimentations a été réalisé sur une lignée cellulaire cybride issue de la fusion de cytoplastes de fibroblastes prélevés lors d'une biopsie chez ledit patient et d'une lignée cellulaire de type rho0 (cellules immortalisées

d'ostéosarcome 143B). En culture, ces cellules arborent un taux d'hétéroplasmie d'environ $65 \pm 2\%$ mais ne présentent étonnement qu'un déficit respiratoire de l'ordre de $10 \pm 2\%$ alors qu'avec 9497 pb, c'est un ADNmt amputé de plus du tiers de sa séquence codante soit plus de 14 gènes codant pour 8 protéines de la chaîne respiratoire (ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, Cox III, ATP6, ATP8 ainsi qu'une partie du cytochrome b) et 6 ARNt (**Figure 29**). C'est donc sur ce modèle que repose l'étude présentée dans le présent chapitre.

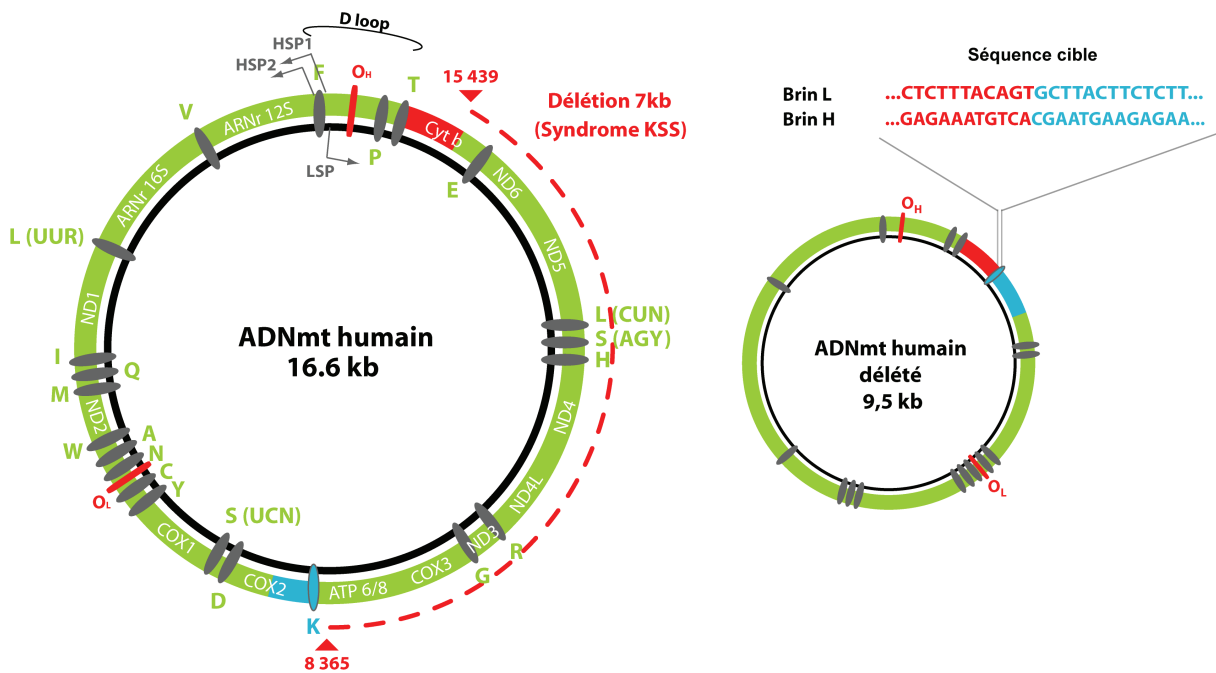


Figure 29 : Carte de l'ADNmt humain sauvage et déléte.

Notre modèle d'étude est un ADNmt de 9,5 kb (à droite) obtenu suite à une délétion de plus de 7kb. Les bornes de la délétion sont représentées en rouge (gène Cyt b) et bleu (gène ARNt^{Lys}) et créent un site unique qui est la cible des ARN recombinants.

1.2 Développement et caractérisation des ARN recombinants FD-H et FD-L

Notre stratégie s'appuie sur de précédentes études ayant permis de mettre en évidence les déterminants d'import d'un ARNt de levure importé dans les mitochondries. En effet, rappelons que chez *Saccharomyces Cerevisiae*, 3 ARNt^{Lys} isoaccepteurs peuvent être dénombrés. Le premier, TRK2 (ARNt^{Lys}_{UUU}) codé par le génome nucléaire est strictement cytoplasmique et ne peut être importé au sein des mitochondries. Le second, TRK3 (ARNt^{Lys}_{UUU}), est quant à lui codé par le génome mitochondrial et exclusivement mitochondrial. Mais il existe un troisième exemplaire de cet ARNt^{Lys}, nommé TRK1 (ARNt^{Lys}_{CUU}) qui a la particularité de coexister avec son alter ego cytoplasmique et d'être

importé pour pallier un défaut respiratoire dû à un dysfonctionnement de TRK3 (Kamenski et al., 2007). C'est cette dernière version qui ayant suscité notre curiosité a été à la base de nos recherches actuelles et a permis d'imaginer la stratégie thérapeutique que nous tentons de développer. Son étude a permis de mettre à jour les éléments structuraux qui autorisent son import au sein des mitochondries et d'ériger la base de notre travail actuel.

Ces études ont ainsi conduit à la création de F1D1, un petit ARN de 39 bases issu de la fusion des hélices F et D de TRK1 séparées par un linker (Kolesnikova et al., 2010). Avec une efficacité d'import 10 fois supérieure à celle de TRK1 et une taille restreinte, cet ARN constitue donc un vecteur de choix pour adresser au sein des mitochondries humaines une séquence anti-répllicative apte à cibler spécifiquement l'ADNmt mutant et à en stopper la réplication (**Figure 30**).

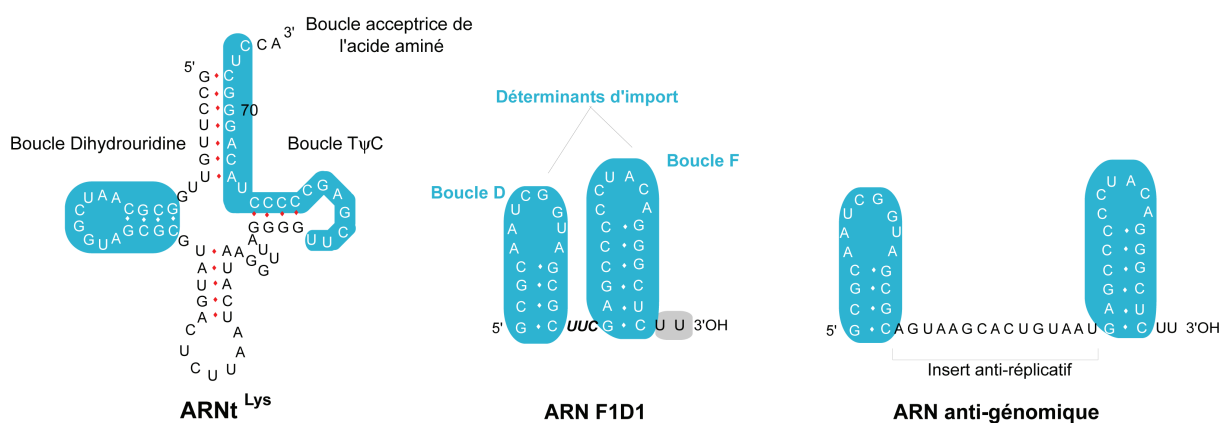


Figure 30 : Structure des ARN ayant servis à la construction des ARN anti-génomiques

Les déterminants d'import présentés ici en bleu et identifiés dans l'ARNt^{Lys} de levure (à gauche) sont à la base de la création des ARN anti-génomiques dont un exemple est montré à droite. Au centre, l'ARN minimal F1D1 où le linker peut être remplacé par un insert anti-réplectif.

Pour ce faire, la première étape a consisté en une phase de modélisation *in silico* des ARN dont je présenterai plus en détails dans le **chapitre III** les règles régissant la construction. Des séquences linéaires complémentaires à l'ADNmt mutant ont ainsi été insérées en lieu et place du linker séparant les hélices F et D. La spécificité d'action de ces ARN recombinants réside dans la création d'un site unique issu du réarrangement des 2 extrémités de l'ADNmt au niveau des gènes du cytochrome b (nucléotide 8 363) et de l'ARNt^{Lys} (nucléotide 15 438) laissées libres lors de la délétion. Cette séquence nouvellement créée nous sert alors de cible pour nos ARN anti-génomiques qui chevauchent alors les bornes de la délétion. Cette première phase a permis d'aboutir à la création des ARN FD-L (insert de 22 bases se liant au brin H) et FD-H (insert de 15 bases se liant au brin L) (**Figure**

32). Une fois, ces ARN en notre possession, la seconde étape a consisté à tester les différents paramètres leur conférant un potentiel thérapeutique à savoir : une spécificité d'hybridation vis-à-vis de l'ADNmt mutant, la capacité d'être importé *in vitro* et *in vivo*, la possibilité d'induire un arrêt de la réplication et enfin et surtout la capacité d'induire un changement d'hétéroplasmie.

1.3 Effet des ARN anti-KSS sur le niveau d'hétéroplasmie

Pour déterminer l'effet des ARN recombinants sur le niveau d'hétéroplasmie, des cellules cybrides en culture ont été transfectées avec les ARN ayant passé tous les tests préalables établissant leur potentiel anti-réplicatif. Une aliquote des cellules transfectées est récoltée chaque jour sur une période de 8 à 10 jours suivant la transfection. Après extraction, l'ADN est analysé par qPCR pour déterminer le niveau d'hétéroplasmie atteint au jour de collection grâce à deux couples d'amorce.

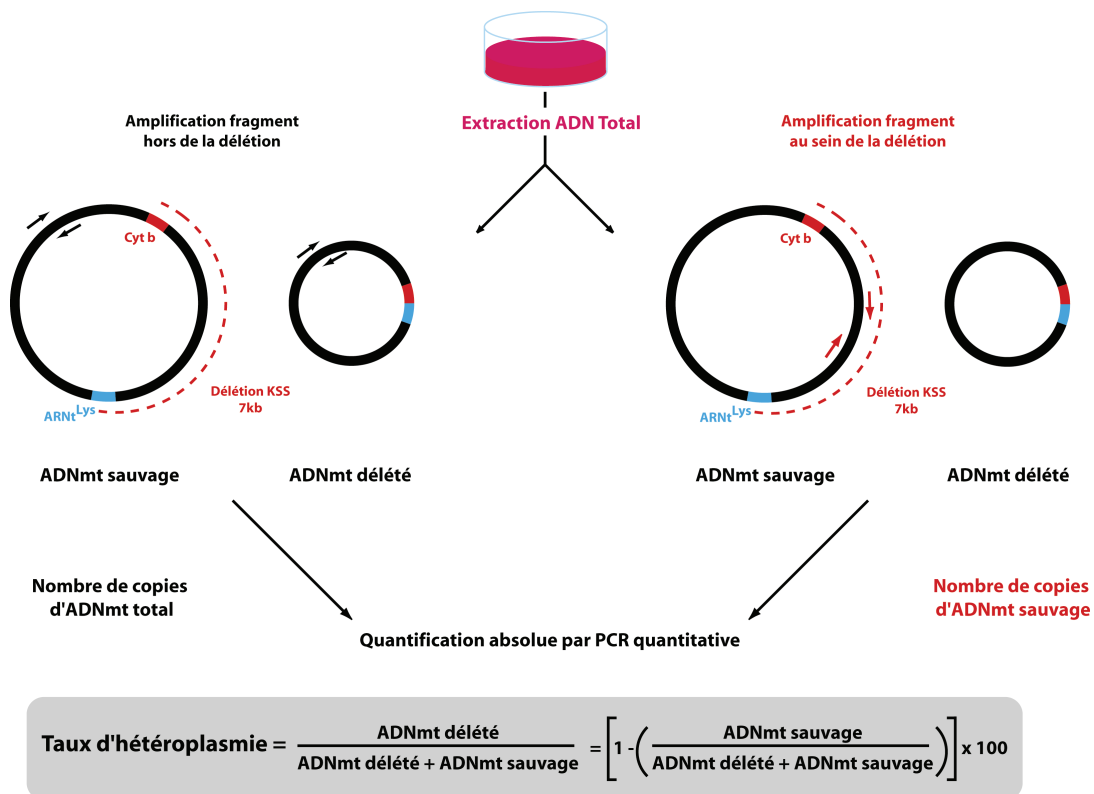


Figure 31 : Principe de mesure du taux d'hétéroplasmie par qPCR

Le taux d'hétéroplasmie se calcule en établissant le rapport entre ADNmt délété et ADNmt total selon la formule présentée. Pour cela, l'estimation du nombre de copies s'appuie sur l'amplification de 2 fragments, l'un hors de la délétion (à gauche) représentant le nombre de copies d'ADNmt total et l'autre eu sein de la délétion (à droite) qui permet d'estimer le nombre de copies d'ADNmt sauvage. Les bornes de la délétion sont représentées en rouge et bleu.

Le premier permet d'amplifier préférentiellement un fragment d'ADN en dehors de la délétion permettant d'extrapoler le nombre de copies d'ADNmt total, quant au second, il est spécifique d'un fragment au sein de la délétion qui est représentatif du niveau d'ADNmt non délété. Le ratio entre ADNmt sauvage et ADNmt total permet alors d'en déduire le nombre de copies d'ADNmt porteur de la délétion et *in fine* le taux d'hétéroplasmie de la cellule (Figure 31).

Dans le cas qui nous préoccupe, les cellules ont donc été transfectées avec les ARN ayant réussi à passer toutes les étapes de sélection (FD-H et FD-L). Ils ont ainsi induit une diminution du taux d'hétéroplasmie amorcée au 4^{ème} jour suivant la transfection et atteignant un pic d'environ 20% d'inhibition au 6^{ème} jour, avant de retourner à son niveau initial au bout de 8 jours. Etant donné que ces ARN, chacun modélisé pour cibler un brin de l'ADNmt ont pu induire individuellement une diminution conséquente du niveau d'hétéroplasmie, une transfection simultanée avec les 2 ARN a alors été effectuée. Cette action a eu pour conséquence un effet synergique des 2 ARN, la baisse du taux d'hétéroplasmie atteignant alors 35% et ce dès le 4^{ème} jour suivant la transfection (Figure 32). Bien que l'effet combiné de ces 2 ARN soit plus rapide et plus important, la baisse engendrée n'a malheureusement pas pu être maintenue au-delà de 8 jours, le taux d'hétéroplasmie initial étant recouvré. Même si cet effet n'est que transitoire, cet essai est le premier exemple concluant de stratégie anti-génomique développé *in vivo*.

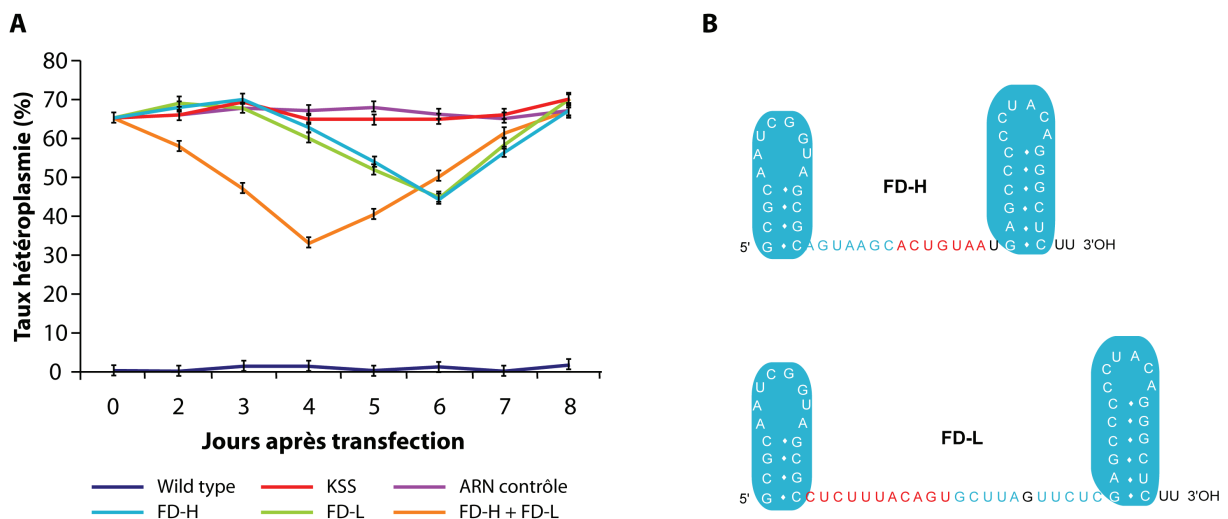


Figure 32 : Effet des ARN recombinants sur le taux d'hétéroplasmie

(A) Evolution du taux d'hétéroplasmie après transfection. Les cellules cybrides ont été transfectées de manière transitoire avec les ARN FD-H et FD-L et le taux d'hétéroplasmie suivi sur une période de 8 jours. On constate une diminution de 30% à 35% du taux d'hétéroplasmie lorsque les cellules sont transfectées simultanément avec les 2 ARN. (B) Structure des ARN recombinants FD-H et FD-L utilisés lors de la transfection.

2. Etude de l'action des ARN anti-KSS sur le mécanisme de réplication *in vivo*

2.1 Principe d'analyse de la réplication d'ADN par électrophorèse bidimensionnelle

Après avoir mis en évidence une diminution notable du taux d'hétéroplasmie, encore fallait-il fournir la preuve que les ARN agissaient *in vivo* sur la réplication de l'ADNmt mutant et y induisaient une pause. C'est sur cet aspect que mon travail sur le modèle de la délétion s'est concentré. Le premier de mes objectifs a consisté à établir la preuve directe de l'action des ARN recombinants sur le processus de réplication de l'ADNmt mutant. Pour cela, j'ai adapté à nos besoins une technique qui n'avait jusque là encore jamais été utilisée au laboratoire, à savoir l'électrophorèse bidimensionnelle d'ADNmt. Cette technique offre la possibilité de cartographier les origines de réplication et de déterminer le sens de progression de la fourche de réplication, mais également de localiser les sites de pause ou de terminaison de la réplication, et potentiellement de distinguer les différents mécanismes de réplication qui s'appliquent (Pohjoismaki et al., 2006).

Assez simple, tout du moins sur son principe, cette technique permet de séparer les fragments d'ADN, tout d'abord sur la base de leur masse puis en fonction de leur volume hydrodynamique (c'est-à-dire la combinaison de leur masse et de leur volume). 2 migrations successives sont donc nécessaires. La première se déroule à bas voltage sur un gel présentant une faible réticulation, tandis que la seconde étape s'effectue à plus haut voltage et basse température dans un gel d'agarose plus réticulé et contenant une forte concentration d'agent intercalant. Ce dernier a pour rôle de rigidifier la structure des intermédiaires de réplication, leur séparation s'en trouvant amplifiée, les plus infimes changements pourront alors être détectés (**Figure 33**).

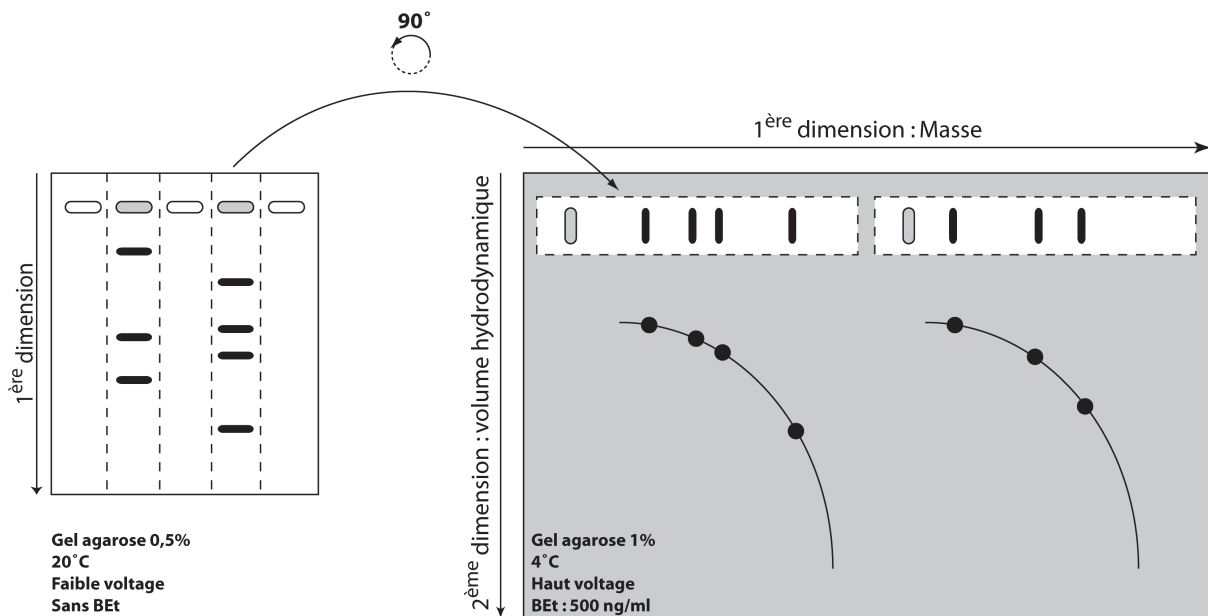


Figure 33 : Schéma explicatif du principe de l'électrophorèse bidimensionnelle

Représentation schématique de l'électrophorèse bidimensionnelle. La séparation des intermédiaires de réplication se fait en 2 étapes. Tout d'abord en fonction de la taille des fragments (à gauche), puis en fonction de leur volume hydrodynamique (à droite). Après transfert, la membrane est hybridée avec une sonde spécifique permettant de visualiser les fragments d'intérêt.

Cette seconde étape est l'étape clé dans l'identification des mécanismes de réplication, des structures ramifiées telles que des fourches de réplication occupant un volume plus conséquent que des molécules de même masse mais linéaires. Pour caractériser au mieux les mécanismes de réplication, cette technique est généralement associée à l'utilisation d'enzymes de restriction qui permettent de fragmenter les molécules circulaires et apportent des informations supplémentaires sur les structures mises en jeu.

Enfin, après transfert sur une membrane de nitrocellulose, on passe à l'étape de détection via une version modifiée de la technique du Southern Blot et l'utilisation d'une sonde spécifique aux fragments ciblés.

En résumé, cette technique permet d'identifier les structures adoptées lors de la réplication d'un fragment d'ADN, et par extension nous renseigne alors sur leur mode de réplication. Par exemple, nous pouvons déterminer si la réplication se fait plutôt via la formation d'une fourche de réplication unidirectionnelle, de 2 fourches issues d'une bulle de réplication ou bien encore de 2 fourches convergentes l'une vers l'autre (**Figure 34**).

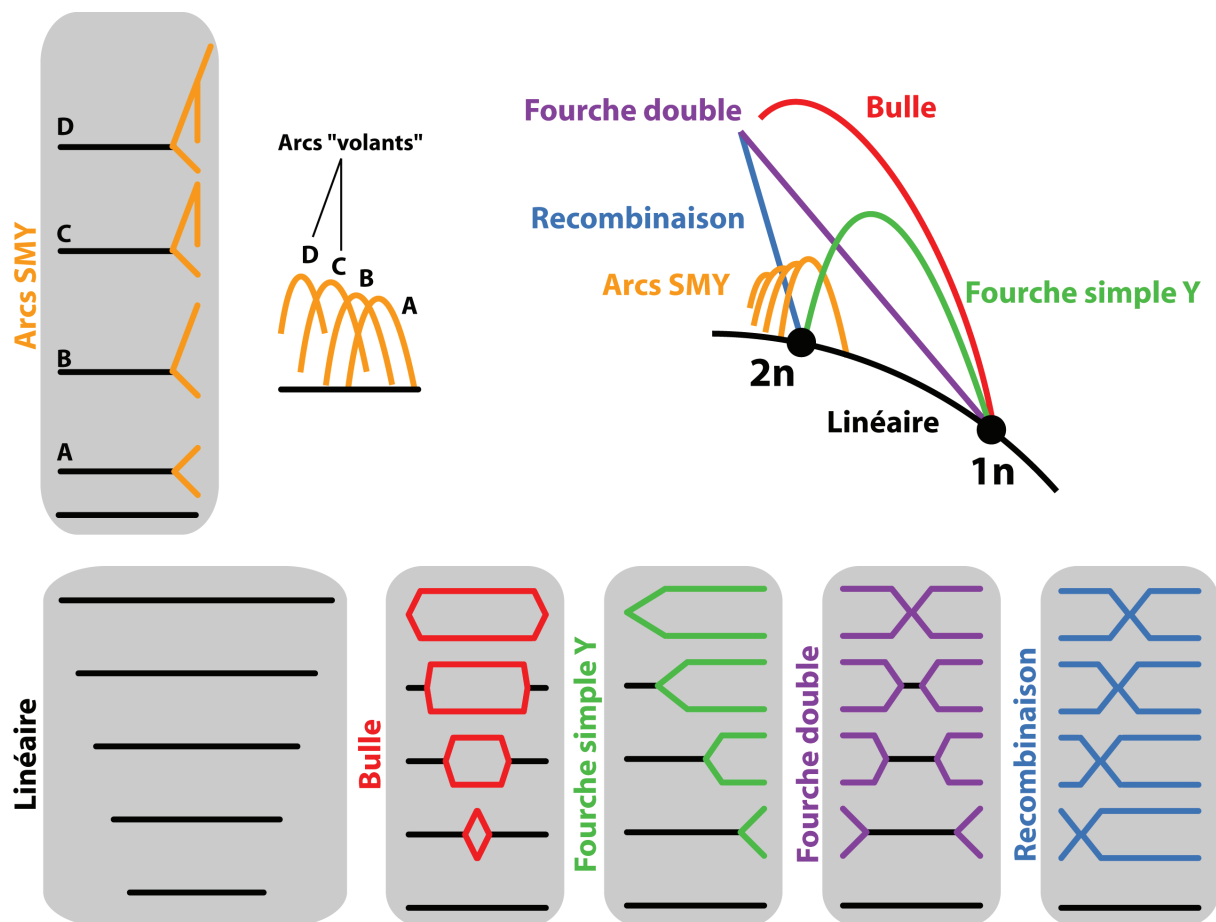


Figure 34 : Profil de migration des intermédiaires de réplication

L'analyse de la courbure de l'arc généré lors de la migration permet de déterminer les structures adoptées lors de la réplication. 5 grands types de structures peuvent être envisagés. $1n$ correspond à 1 unité de fragment d'ADNmt digéré non répliqué. $2n$ correspond à ce même fragment mais qui a été répliqué. A gauche (en jaune) sont représentés des arcs SMY, spécifiquement retrouvés dans l'étude des intermédiaires de réplication de l'ADNmt. Adapté de (Schvartzman et al., 2010)

Initialement développée pour localiser les origines de réplication d'un plasmide de levure (Brewer and Fangman, 1987), l'utilisation de l'électrophorèse bidimensionnelle s'est considérablement étendue, comme par exemple pour étudier les origines de réplication chromosomiques (Brewer and Fangman, 1991), comprendre le mécanisme de rolling-circle chez le phage T4 (Belanger et al., 1996) ou bien encore décortiquer la complexité topologique de plasmide ADN (Martin-Parras et al., 1998).

Par la suite, la puissance de cette méthode a été mise à profit pour étudier les mécanismes réplcatifs au sein des mitochondries, mais une telle quête ne se fait pas sans difficultés, car transposer la méthode d'électrophorèse bidimensionnelle à ce type de génomes soulève de nombreux problèmes techniques et nécessite d'adapter les protocoles généralement utilisés. En effet, comme nous l'avons vu précédemment au cours de **l'Introduction**

(**chapitre I-6.1.2**), les mécanismes qui gouvernent la réplication de l'ADNmt sont sujets à d'intenses débats et la voie par laquelle l'ADNmt est répliqué est toujours inconnue. Dans un tel contexte, les règles générales ne sont plus d'usage, certains types d'intermédiaires n'étant pas rencontrés lors de la réplication de l'ADNmt, comme des structures croisées, signe de recombinaison, ou des fourches doubles. Inversement, l'étude des mécanismes de réplifications dans l'ADNmt peut faire apparaître des intermédiaires additionnels sous la forme d'arcs SMY (pour « Slow Moving Y-like arc »). Ce type d'arc est comparable à une fourche de réplication simple (fourche Y) mais où le site de restriction ne sera pas coupé dû à la présence d'ARN, de régions simple brin ou d'un autre site de blocage. Sa trajectoire ressemble donc à celle d'un arc Y mais commence à partir d'un point situé plus en amont sur l'arc principal correspondant aux fragments linéaires (**Figure 34**). Des arcs SMY dits « volants » débutent quant à eux au niveau d'un point décalé par rapport à cette diagonale et sont le signe d'une origine de réplication unidirectionnelle s'ils contiennent une branche considérée comme statique ([Wanrooij et al., 2007](#)). De plus, il a été démontré que ce type d'arc contient des hybrides ADN/ARN, un traitement à la RNase H faisant disparaître de telles structures.

2.2 Action anti-répllicative des ARN anti-KSS in vivo

Dans le but de démontrer que les ARN recombinants ciblant la délétion KSS affectent de manière spécifique la réplication du génome mutant et uniquement celui-ci, nous avons étudié les intermédiaires de réplication générés dans des lignées sauvage et mutante après transfection avec nos ARN. Même si, comme mentionné plus haut, le principe de cette méthode reste simple, son application à notre problème se heurte à plusieurs difficultés. Tout d'abord, l'étape d'extraction et de purification de l'ADNmt est un élément réclamant une attention toute particulière, le point critique de cette expérience étant d'extraire l'ADNmt tout en conservant les intermédiaires de réplication intacts. Sur la base de ce postulat, les techniques d'isolation standards ne peuvent pas être utilisées car elles ne prennent pas en compte la présence de fragments d'ARN dans l'échantillon et risqueraient d'endommager les structures mises en jeu. A cela, il faut ajouter que de telles méthodes entraînent une diminution drastique de la quantité finale d'ADNmt extraite. Enfin, dans le cas où une purification sur gradient de césium serait envisagée, nous risquons d'introduire

un biais dans la composition du contenu mitochondrial, la séparation se faisant sur la base d'une richesse en A/T différente, certaines fractions contenant des structures complexes ou super-enroulées seront alors exclues de cette extraction (Lorimer, 2002).

Cette technique n'ayant jamais été utilisée au laboratoire, j'ai donc dû adapter le protocole (Reyes et al., 2007) pour qu'il réponde à nos besoins en optimisant les conditions d'isolation de l'ADNmt pour cette analyse.

Hormis des problèmes techniques d'ordre général, un second problème plus spécifique et inhérent à notre modèle d'étude se pose : l'existence simultanée de 2 génomes au sein de la même cellule. En effet, de tailles et en proportions différentes, l'analyse simultanée de 2 fragments d'ADNmt sur le même gel est une situation inhabituelle, les intermédiaires de réplication générés au sein de l'ADNmt sauvage peuvent masquer la migration de ceux induits lors de l'arrêt de la réplication du génome muté.

Pour minimiser cet effet, le choix des sites (et donc de l'enzyme) de restriction doit être fait avec attention pour que les fragments obtenus soient d'une taille facilement distinguables sur gel et que la coupure n'ait pas lieu à proximité de la zone ciblée par les ARN. Autre paramètre à prendre en considération : la température. En effet, il est préférable que l'enzyme utilisée ait une efficacité optimale dans une gamme de température n'excédant pas 37°C, dans le cas contraire ceci pourrait entraîner la séparation des brins dans l'intermédiaire de réplication et donc fausser l'analyse. Face à ces critères et après avoir passé en revue les différentes possibilités, j'ai ainsi retenu l'enzyme *BlnI* (GC/TNAGC) qui génère un total de 6 fragments pour chaque lignée dont un fragment de 11,6 kb pour l'ADNmt sauvage et de 4,5 kb pour l'ADNmt délété (**Figure 35**). Ce sont ces fragments dont les extrémités se situent aux environs de chacune des origines de réplication qui vont être à la base de notre analyse.

Il convient donc d'adapter les conditions de migration en fonction de la taille du fragment muté en modifiant la réticulation du gel ou bien encore le voltage et la durée lors de la migration, et ce pour chacune des dimensions de l'analyse. En effet, avec une différence de 7 kb entre les fragments générés un nouveau problème apparaît, à savoir que le fragment d'intérêt généré pour le fragment sauvage, qui est de plus grande taille, risque de masquer la migration du fragment muté.

Enfin, le dernier point d'importance concerne l'élaboration de la sonde pour l'étape d'hybridation. Cette sonde a été obtenue par PCR en considérant le site issu de la délétion mais sa taille avoisinant les 750 pb il est impossible d'espérer une hybridation spécifique au fragment mutant, celle-ci s'hybride donc à la fois aux fragments sauvage et mutant.

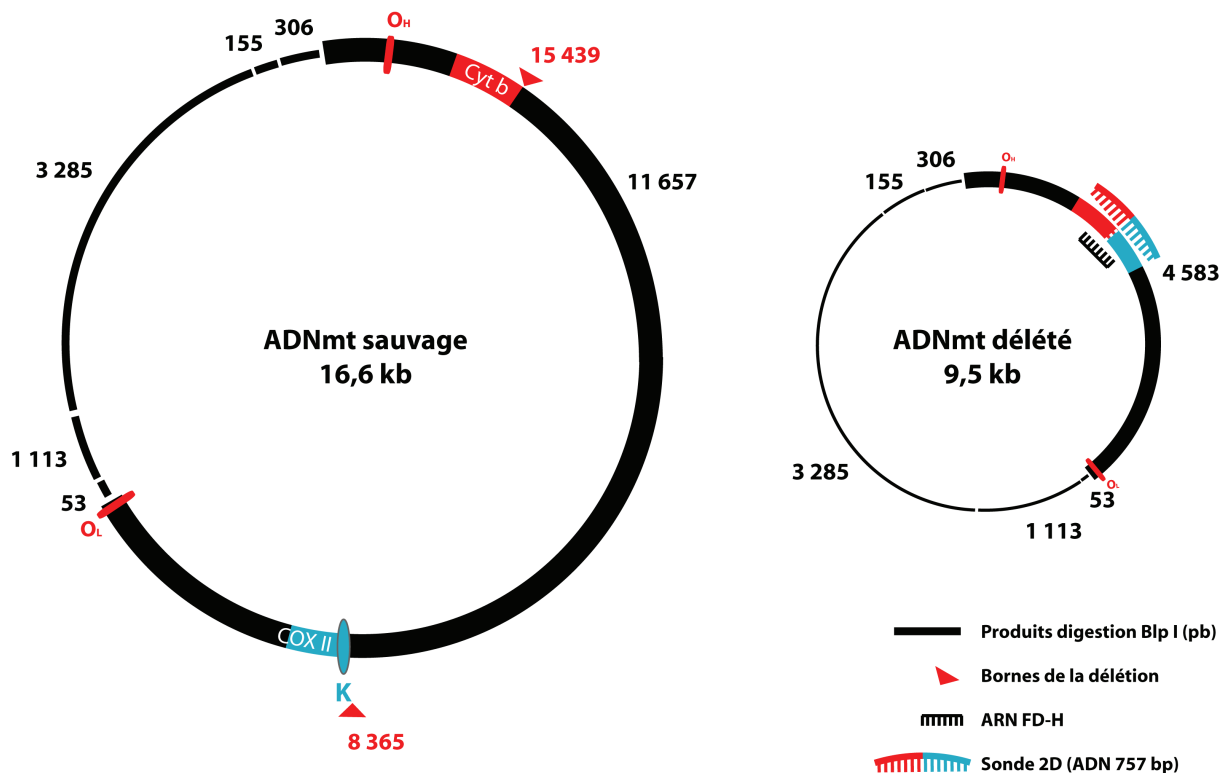


Figure 35 : Cartographie des fragments d'ADNmt après digestion par *BlnI*

Sont représentés ici les fragments issus de la digestion de l'ADNmt par *BlnI*. Les fragments hybridés à la sonde spécifique lors de l'électrophorèse bidimensionnelle sont représentés en surépaisseur, avec en rouge (Cyt b) et en bleu (Cox II et l'ARNt Lysine) les bornes du site unique créé suite à la délétion aux positions indiquées par les flèches rouges (positions nucléotidiques 8 365 et 15 439).

Après avoir optimisé les conditions d'analyse de nos échantillons, j'ai procédé à une étude comparative. Pour cela, j'ai transfecté de manière transitoire des cellules cybrides de la lignée porteuse de la délétion avec l'ARN FD-H. Les échantillons à analyser sont collectés 4 jours après la transfection (**Figure 36**). Le profil de migration des intermédiaires de réplication générés pour les cellules sauvages est identique avant et après transfection indiquant que la réplication de l'ADNmt sauvage n'est en aucun cas affectée par la présence de l'ARN FD-H. En revanche, concernant les cellules porteuses de la délétion, nous observons, et ce de manière reproductible l'apparition d'un signal correspondant à l'accumulation d'intermédiaires de même conformation. La localisation de ce signal au niveau d'un site spécifique situé au niveau de la jonction des bornes de la délétion peut se

traduire par le fait que l'ARN FD-H induit une pause de la réplication au niveau de son site d'hybridation. **(Figure 36)**. Dans le cas de cellules non transfectées ou transfectées avec TRK1, celui-ci ne présentant aucune homologie avec l'ADNmt mutant, aucun intermédiaire de réplication correspondant à une pause dans la progression de la fourche n'a pu être observé. Ceci démontre que l'import des ARN recombinants au sein des mitochondries humaines conduit à un arrêt de la réplication amenant ainsi à une diminution du taux d'hétéroplasmie.

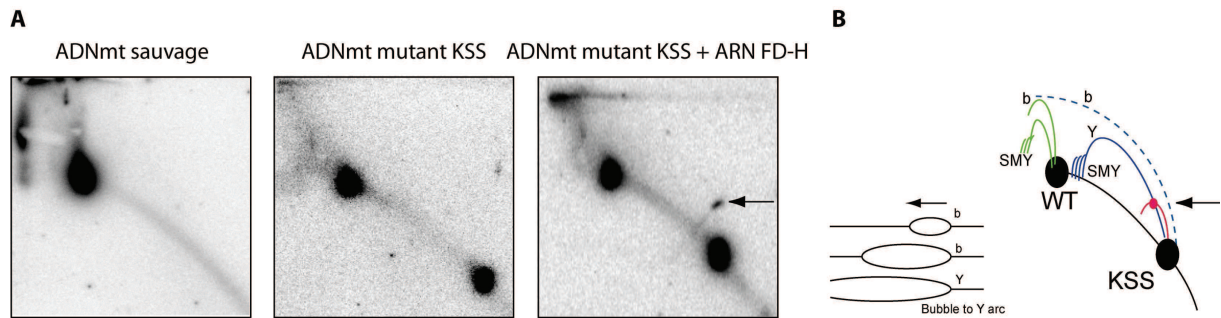


Figure 36 : Effet des ARN recombinants sur la réplication de l'ADNmt mutant in vivo

(A) Autoradiographies des intermédiaires de réplication générés après transfection avec l'ARN FD-H. Les résultats montrent la présence d'une ponctuation (flèche), signe d'une pause dans la progression de la fourche de réplication. **(B)** Représentation schématique des intermédiaires de réplication : en vert les intermédiaires de réplication correspondant à l'ADNmt sauvage (**WT**) ; en bleu ceux correspondant à l'ADNmt mutant (**KSS**) ; **b** : bulles de réplication ; **Y** : fourche simple de type Y ; **SMY** : Slow Moving Y-like arc. (Comte et al., 2013)

L'ensemble des résultats compilant les données recueillies sur le développement de la stratégie anti-génomique sont rassemblés dans l'**Article n°2** qui suit.

 Article n°2**Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome**

Caroline Comte^{1&}, Yann Tonin^{1&}, Anne-Marie Heckel-Mager^{1&}, Abdeldjalil Boucheham¹, Alexandre Smirnov¹, Karine Auré², Anne Lombès², Robert P. Martin¹, Nina Entelis^{1,*} and Ivan Tarassov^{1,*} (2013) *Nucleic Acids Res.* **41** (1) : 418-33

¹Department of Molecular and Cellular Genetics, UMR Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie (GMGM), CNRS – Université de Strasbourg, Strasbourg, France

²Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moelle (CRICM); INSERM UMRS 975, CNRS UMR 7225, UPMC, Paris, France

& Ces auteurs doivent être considérés comme 1^{er} auteurs

Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome

Caroline Comte¹, Yann Tonin¹, Anne-Marie Heckel-Mager¹, Abdeldjalil Boucheham¹, Alexandre Smirnov¹, Karine Auré², Anne Lombès², Robert P. Martin¹, Nina Entelis^{1,*} and Ivan Tarassov^{1,*}

¹Department of Molecular and Cellular Genetics, UMR Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie (GMGM), CNRS - Université de Strasbourg, Strasbourg and ²Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moëlle (CRICM); INSERM UMRS 975, CNRS UMR 7225, UPMC, Paris, France

Received June 2, 2012; Revised September 22, 2012; Accepted September 25, 2012

ABSTRACT

Mitochondrial mutations, an important cause of incurable human neuromuscular diseases, are mostly heteroplasmic: mutated mitochondrial DNA is present in cells simultaneously with wild-type genomes, the pathogenic threshold being generally >70% of mutant mtDNA. We studied whether heteroplasmy level could be decreased by specifically designed oligoribonucleotides, targeted into mitochondria by the pathway delivering RNA molecules *in vivo*. Using mitochondrially imported RNAs as vectors, we demonstrated that oligoribonucleotides complementary to mutant mtDNA region can specifically reduce the proportion of mtDNA bearing a large deletion associated with the Kearns Sayre Syndrome in cultured trans-mitochondrial cybrid cells. These findings may be relevant to developing of a new tool for therapy of mtDNA associated diseases.

INTRODUCTION

Mitochondria are responsible for many cellular processes ranging from respiration to apoptosis, and their dysfunctions have severe consequences. Mammalian mitochondrial DNA (mtDNA) is a closed circular molecule of

16.5 kb, encoding 13 core proteins that contribute to oxidative phosphorylation, 2 ribosomal RNAs (rRNAs) and 22 transfer RNAs (tRNAs) needed for the biosynthesis of these 13 peptides in the mitochondrial matrix (Figure 1A). More than 200 human neuromuscular incurable diseases were associated with mtDNA mutations (1). One of the striking particularities of the majority of these pathologies is the simultaneous presence of mutant and wild-type (WT) mitochondrial genomes in the same cell, the heteroplasmy (2). Two approaches were proposed to address mtDNA-associated pathologies by gene therapy. In some cases, defects may be rescued by targeting into mitochondria nuclear DNA-expressed counterparts of the affected molecules, approach called 'allotopic' strategy (3–7). Reducing the level of heteroplasmy, 'antigenomic' strategy, is another possibility. To this last goal, several approaches were tested. One example is mitochondrial targeting of restriction endonucleases cleaving mutated mtDNA molecules (8–10). Another one was to specifically design synthetic peptide nucleic acids (PNA) molecules inhibiting mutant mtDNA replication. They revealed to be efficient *in vitro* but not able to cross the inner mitochondrial membrane and, as a result, not capable of interacting with mtDNA *in vivo* (11–14).

We have exploited RNA mitochondrial import pathway to target into human mitochondria RNAs able to hybridize with the mutated mtDNA and to inhibit selectively its replication. Import of nuclear DNA-encoded RNAs into

*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 3 68 85 14 81; Fax: +33 3 68 85 13 65; Email: i.tarassov@unistra.fr
Correspondence may also be addressed to Nina Entelis. Tel: +33 3 68 85 14 60; Fax: +33 3 68 85 13 65; Email: n.entelis@unistra.fr
Present addresses:

Alexandre Smirnov, Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Josef Schneider-Str. 2/D1597080 Würzburg, Germany.
Karine Auré, AP/HP Hôpital Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt, France.

The authors wish it to be known that, in their opinion, the first three authors should be regarded as joint First Authors.

© The Author(s) 2012. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>), which permits non-commercial reuse, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com.

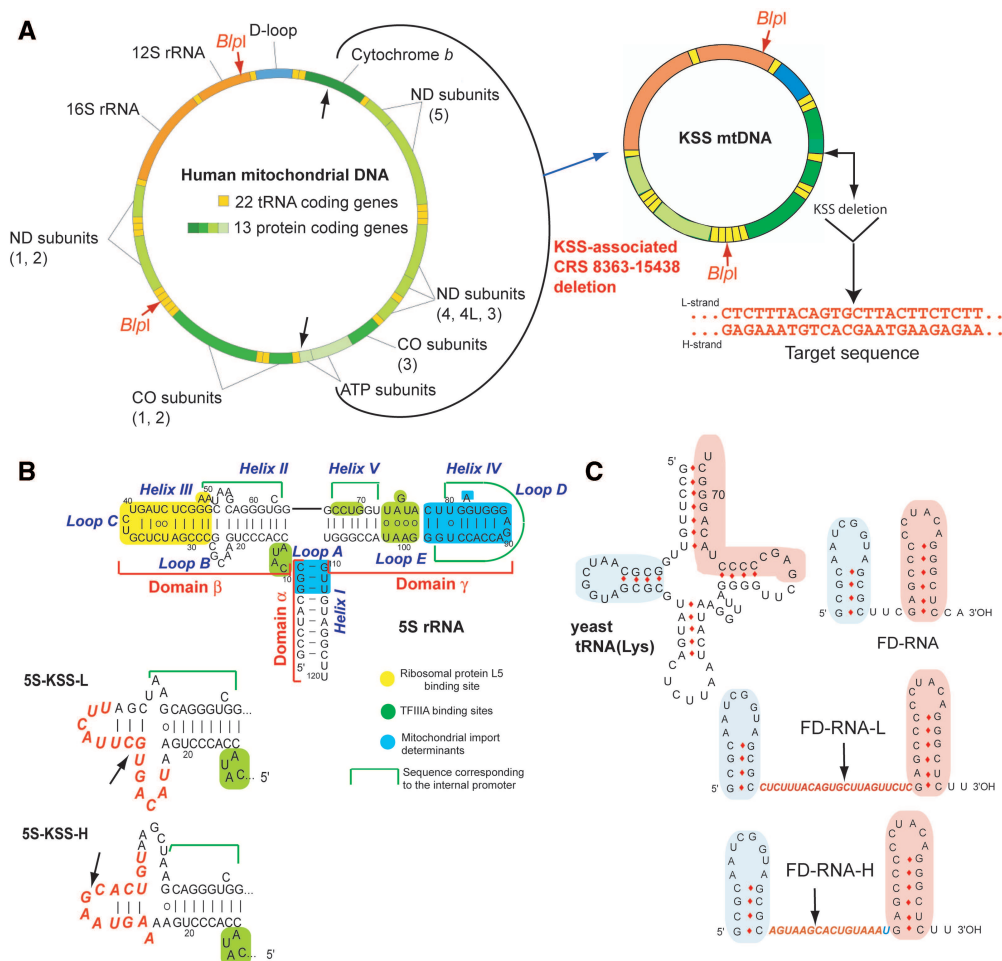


Figure 1. KSS deletion in human mtDNA and anti-genomic RNAs design. (A) Genetic maps of wild-type and mutant KSS mtDNAs. Target sequence, the sequence of deletion boundaries is shown in red. (B) Secondary structure of human 5S rRNA and its functional elements. Below, secondary structures of recombinant 5S rRNA β -domains (inserts in red). The arrows show the deletion point. (C) The structures of yeast tRNA^{Lys}, short synthetic FD-RNA and two recombinant RNAs containing inserts corresponding to L- and H-strands of KSS-mtDNA (in red). Two domains derived from the tRNA (32) are shown in pink and blue. The arrows show the deletion boundaries point.

mitochondria is a widely spread phenomenon; however, the types, number of imported RNAs and targeting mechanisms vary among species (15–17). Mammalian mitochondria were reported to import several types of small non-coding RNAs (18), including several microRNAs (19–21), some tRNAs (in natural or artificial manner) (22,23), RNA components of RNase P and MRP endonuclease (24,25) and 5S rRNA (26–28). Recently, we demonstrated that 5S rRNA import mechanism can rely on protein import factors identified as the mitochondrial enzyme rhodanese and the precursor of mitochondrial ribosomal protein MRP-L18 (29,30), interacting with two structural motifs of the 5S rRNA molecule (Figure 1B), whereas the third motif, so called β -domain, may be either deleted or replaced without loss of import capacity (31). Additionally, analysis of artificial import of yeast tRNAs derivatives into human mitochondria (26) permitted us to design short synthetic RNAs (referred to as FD-RNA) comprising two domains of the tRNA (Figure 1C) and characterized by a high efficiency of mitochondrial import (32). Here, we show that

these two types of molecules can serve as vectors to deliver into mitochondria oligoribonucleotides with a therapeutic potential.

MATERIALS AND METHODS

Clinical case

Patient T was diagnosed with a Kearns Sayre Shy syndrome at the age of 15 years. He was the second child of non-consanguineous parents and had a healthy brother. He first came to medical attention at the age of 9 years for progressive left ptosis, ophthalmoplegia, mild deafness and walking difficulties. He was hospitalized at the age of 15 years. Physical examination disclosed mild ataxia and muscle weakness with amyotrophy. Brain imaging showed white matter hypersignals. Biological analyses showed high CK at 10 times normal values, high protein (2.65 g/l) and lactate (5.6 mM) levels in CSF and high lactate (2.7 mM) in blood. Histological examination of deltoid muscle biopsy showed numerous fibers

with important mitochondrial proliferation ('ragged red fibres') and completely defective cytochrome c oxidase histochemical reaction. Spectrophotometric assays of muscle mitochondrial activities showed high values of both citrate synthase and succinate dehydrogenase activities (above the 95th centile of normal values) reflecting the muscle mitochondrial proliferation as well as low values (below or at the 5th centile of normal values) for cytochrome c oxidase (complex IV) activity and for the ratios of complex I, III, or IV activity to either citrate synthase or complex II. Southern blot analysis of total DNA from muscle showed the presence of a large size deletion involving 72% of the mtDNA molecules. Direct sequencing of the patient's mtDNA showed that the deletion spanned from nucleotide 8363 to 15438, thus removing 7075 base pairs including 9 structural genes (*MT-ATP8*, *MT-ATP6*, *MT-CO3*, *MT-ND3*, *MT-ND4L*, *MT-ND4*, *MT-ND5*, *MT-ND6* and part of *MT-CYB*) and 6 tRNA genes (*MT-TG*, *MT-TR*, *MT-TH*, *MT-TS2*, *MT-TL2* and *MT-TE*).

Transmitochondrial cybrid cell line construction

Cultured skin fibroblasts were derived from the patient's skin biopsy according to routine procedure. After their first passage, they were enucleated and fused to a human rho0 osteosarcoma cell line (143B) kindly provided by Prof. E. Shoubridge, Montreal Institute of Neurology, and cloned by limit dilution as reported (33). Of more than 80 screened clones, only two had the mtDNA deletion, involving 65% mtDNA molecules in one case and 20% in the second case. Cybrid cells containing 65% mutant mtDNA used in this study were characterized by the $10\% \pm 2\%$ decrease of oxygen consumption comparing to control 143B cell line.

Plasmids and recombinant RNAs

For replication *in vitro*, two human mtDNA fragments were cloned in pUC119, 430 bp fragment (nucleotides 15251–15680 of mtDNA) referred to as WT-DNA and 512 bp fragment (nucleotides 8099–8365/15438–15680 of mutant mtDNA) comprising the fusion of the two boundaries of the Kearns Sayre Syndrome (KSS) deletion, referred to as KSS-DNA. Cloning was performed by polymerase chain reaction (PCR) with primers listed in the [Supplementary Table S1](#). For the real-time PCR calibration curves, two plasmids containing the 12S rRNA region not touched by the KSS deletion (nucleotides 109–1714 of mtDNA) and the deleted region (nucleotides 10739–11839 of mtDNA) were constructed using pUC119 vector.

All recombinant 5S rRNA versions' genes were cloned into pUC119 as described (31). Recombinant RNAs were obtained by T7 transcription using the T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System (Promega) on the plasmid DNA or the corresponding PCR products.

For synthesis of fluorescently labeled RNA transcript, Alexa Fluor 488-5-UTP (Molecular Probes) was incorporated in RNA during 2 h T7-transcription by T7-RNA polymerase (Promega). Reaction mixture of total volume 20 μ l contained 0.5 μ g of DNA template, 80 u of T7-RNA

polymerase (2 additions of 40 u each), 0.5 mM of ATP, 0.5 mM CTP, 0.5 mM GTP, 0.37 mM UTP, 0.125 mM Alexa Fluor 488-5-UTP, 10 mM DTT and 40 u of RNaseOUT (Invitrogen). T7-transcript was purified by PAGE. To check the incorporation of the label in purified transcript, we compared the dye absorbance at 492 nm with the absorbance at 260 nm using NanoDrop Microarray Program. The efficiency of labeling obtained was approximately five labeled UTP per one RNA molecule.

For *in vivo* expression, 5S rRNA gene versions were PCR cloned either in pBK-CMV phagemid vector (Stratagene) or in pcDNA3neo/zeo vector (Invitrogen), as described (31).

Mitochondria isolation

Mitochondria from beef liver were isolated as described in (26,34). Mitochondria from cultured HepG2 or cybrid human cells were isolated as described in (34) by several rounds of high (20 000g) and low (4000g) centrifugations. After the second round of high-speed centrifugation of mitochondria, they were re-suspended in the buffer [0.44 M mannitol, 20 mM Tris-HCl (pH 7.0), 20 mM NaCl and 1 mM EDTA] and centrifuged through two layers of sucrose (0.5 M and 1.5 M). Mitochondria were collected on the top of the 1.5 M layer and harvested by high-speed centrifugation. The integrity of mitochondria was checked by a citrate synthase assay (35).

In vitro import

To isolate proteins directing import *in vitro* (IDP), HepG2 cells were harvested in phosphate-buffered saline (PBS) containing 1 mM EDTA, washed with PBS, suspended in NPMD buffer [20 mM Na-Phosphate buffer, pH 6.5 (alternatively replaced by Tris-HCl, pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM MgCl₂, 5 mM DTT] containing the cocktail of protease inhibitors (Boehringer-Mannheim) and disrupted by sonication. Cellular debris was removed by centrifugation, nucleic acids were removed by polyethylenimine treatment (36), proteins were precipitated by ammonium sulfate (80% of saturation) and dialyzed against the NPMD buffer. Import conditions were as described in (26,31) with several modifications. The standard assay (100 μ l) contained isolated mitochondria (100 μ g of mitochondrial protein), 3 pmoles of 5'-end ³²P-labelled RNA and 10 μ g of IDPs in the 'import buffer' [0.44 M mannitol, 20 mM HEPES-KOH (pH 6.8), 50 mM KCl, 2.5 mM MgCl₂, 1 mM ATP, 5 mM DTT, 0.5 mM PMSF, 0.1 mM DIFP, 0.5 mM, phosphoenol pyruvate and 1 unit of pyruvate kinase]. The import assay was carried out at 30°C for 20 min (37). After treatment with a mixture of nucleases (20 u/ml of micrococcal nuclease, 15 μ g/ml of RNase A and 25 u/ml of phosphodiesterase in 2 \times concentrated stock), mitoplasts were generated by treatment with digitonin, at 100 μ g per mg of mitochondrial protein. After incubation for 15 min at 25°C, mitoplasts were harvested by centrifugation and washed twice as described (38). Mitoplasts were then lysed in 1% SDS, 0.1 M sodium acetate (pH 4.8) and 0.05% diethyl pyrocarbonate

at 100°C, and mtRNA was phenol extracted. RNAs were analyzed by denaturing gel electrophoresis, and import was quantified using PhosphorImager (Typhoon-Trio, GE Healthcare).

Isolation of protein fraction containing replication enzymes from beef liver mitochondria

Partial purification of mammalian mitochondrial replication enzymes was performed essentially as described in (39,40). One gram of mitochondria (mitochondrial protein) was lysed in 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.1 M NaCl, 20 mM EDTA, 10% Glycerol, 14 mM 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100 (v/v), 1 mM PMSF and 0.1 mM DIFP for 15 min at 4°C. After removing debris (40000g, 1 h), the supernatant was diluted 1.5 times with 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 20 mM EDTA, 10% Glycerol, 14 mM 2-mercaptoethanol and 1 mM PMSF and loaded on DE52 cellulose column equilibrated with the same buffer with 70 mM NaCl. The main peak eluted at 0.3 M NaCl characterized by maximal activity was used in all analysis. Activity of the DNA polymerase and/or primase was checked by assaying 1–2 µl aliquots of the protein fraction in the presence of single-stranded DNA, [α -³²P]-dCTP and either presence or absence of random primers (pd(N₆) (Promega) in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 0.1 mg/ml of BSA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 100 µM of each dATP, dGTP and dTTP. The assay was performed at 37°C for 1 h, the 10% TCA-precipitated material fixed on a membrane and radioactivity measured in scintillation counter. Incorporation of [α -³²P]-dCTP into nascent DNA was maximal (0.3 pmoles/µg) in the presence of random primers and 3-fold decreased in the absence of primers, indicating that eluted protein fraction contained mitochondrial enzymes capable of priming and elongating nascent DNA molecules.

In vitro replication assay

Double-stranded replication template was prepared by PCR on the cloned mtDNA fragment, to obtain 430 bp fragment (nucleotides 15 251–15 680 of mtDNA) referred to as WT-DNA and 512 bp fragment (nucleotides 8099–8365/15 438–15 680 of mutant mtDNA) referred to as KSS-DNA. To obtain single-stranded templates, we used the method described in (11). Mainly, the same PCRs were performed, but one of the primers was biotinylated (Supplementary Table S1). The PCR products were then fixed on Streptavidin-agarose beads (Fluka), the dsDNA denatured in NaOH (0.1 M) and the non-biotinylated strand was eluted and ethanol precipitated.

For the replication assay, 100 ng of dsDNA or ssDNA was mixed in final volume of 10 µl with [α -³²P]-5'-labeled specific primer (designed in the way to generate full-size replication products of similar size for both WT and KSS mtDNA fragments) in 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM EDTA (TE), heated to 90°C and slowly cooled to 37°C. Then, the mixture was adjusted to 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 20 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 0.1 mg/ml of BSA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 100 µM of each dNTP and 0.5 µl of

mitochondrial protein fraction was added. The reaction was carried out in the presence of variable amounts of recombinant RNAs at 37°C for 1 h. Replication was stopped by addition of 10 µl of 0.2% SDS and 20 µl of TE-saturated phenol, nucleic acids were ethanol-precipitated and analyzed by 6.5% denaturing PAGE followed by phosphor imaging in Typhoon-Trio (GE Healthcare).

Transient and stable transfection of cybrid cells

Transient transfection with synthetic RNAs was performed as described in (31,41), with minor modification: for 2-cm² well of 80% confluent cells, we used 0.25 µg RNA. Transfections were performed with Lipofectamin-2000 in OptiMEM medium (Invitrogen), as proposed in the supplier's protocol. OptiMEM was changed to a standard DMEM medium the next day after the transfection. The efficiency of transfection was estimated by fluorescence-activated cell sorting (FACS) analysis of transfected cells for Alexa Fluor 488 fluorescence 48 h after transfection (in collaboration with Fanny Monneaux and Frederic Gros, IBMC, Strasbourg). Transfection procedure did not lead to detectable decrease of viability of the cells or to significant change of the overall mtDNA amount, suggesting the absence of recombinant RNAs toxicity.

For stable transfection, 0.5–1.0 µg of corresponding linearized plasmid DNA was used for each 10-cm² well of 85%-confluent cells. Transfection was performed with Lipofectamin, as described in the supplier's protocol. Selection (200–400 µg/ml of G418 for pBK-CMV-cloned versions and 150–200 µg/ml of Zeocine for pcDNA3-zeo) was applied after 48 h. Subsequent cloning was performed by serial dilution method.

RNA stability and mitochondrial import *in vivo*

Mitochondria were isolated from cybrid cells as described earlier (31,34), treated with digitonin to generate mitoplasts (mitochondria devoid of their outer membrane) and RNase A to get rid of non-specifically attached RNA. Such a treatment allows to obtain mitochondria completely free of cytosolic RNA contamination, including 5.8S rRNA, which can be strongly attached to the outer mitochondrial membrane upon cell disruption. However, during the RNase and digitonin treatment and multiple re-purification of organelles by centrifugation, an important part of mitochondria can be partially disrupted, and thus mitochondrial RNA can be partially degraded. In fact, we recover only 20–50% of intact mtRNA, and this yield varies in different experiments (Supplementary Figure S5B). Total and mitochondrial RNA were isolated with TRIZol reagent (Invitrogen).

Expression and mitochondrial import of recombinant 5S RNAs were detected by one-step reverse transcriptase (RT)-PCR (Qiagen) with primers listed in Supplementary Table S1. The PCR products were separated by gel electrophoresis, visualized by ethidium bromide staining and quantified using G-Box software. For quantification of recombinant 5S RNA molecules in cells and

mitochondria, known amounts (0.5–500 fg) of corresponding T7-transcripts were used as a template for RT-PCR (Supplementary Figure S8). Linear dependence between the fluorescence of PCR fragment and the template RNA amount was obtained in the range from 0.5 to 50 fg RNA per assay, thus allowing the semi-quantitative estimation of recombinant 5S RNA molecules presence in cells and mitochondria.

Stability and mitochondrial import of small artificial FD-RNA molecules were analyzed by Northern hybridization of total and mitochondrial RNA with ³²P-labeled oligonucleotide probes against the FD recombinant RNA or against control cytosolic and mitochondrial RNA (Supplementary Table S1). To compare the stability of different recombinant RNA, relative concentration of each RNA in various time period after transfection was calculated as a ratio between the specific probe signal and the signal for cytosolic 5.8S rRNA probe.

Relative amount of each imported RNA inside the mitochondria was estimated after quantification by Typhoon-Trio scanner as a ratio between the signal obtained after hybridization with FD probe and the signal obtained after hybridization with a probe against the mitochondrial tRNA^{Leu} in the same RNA preparation, as described previously (31). To compare import efficiencies of different RNA molecules, total level of each RNA molecules in transfected cells should be taken into account and normalized. For this, the amount of imported RNA inside the mitochondria was divided by the ratios calculated in the same way but in total RNA preparation, which indicate the total level of recombinant RNA in the cells.

To quantify the recombinant RNA molecules in the mitochondrial fraction after transfection, the signal obtained after mitochondrial RNA hybridization with specific probe was compared with the signals corresponding to 10–50 ng of corresponding T7-transcripts loaded on the same gel. The values were normalized to the amount of cells used for mitochondria isolation. MtDNA molecules were quantified by real-time qPCR (iCycler, MyiQ™ Real-Time Detection System, Biorad).

mtDNA heteroplasmy level analysis

To isolate total DNA from transfected cells, the cells were solubilized in 0.5 ml of buffer containing 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM NaCl, 25 mM Na-EDTA and 1% SDS, then 10 µl of proteinase K solution (20 mg/ml) was added and the mixture incubated for 2 h at 50°C; 50 µl of 5 M NaCl was added and DNA precipitated by isopropanol.

Heteroplasmy level was analyzed by real-time qPCR using SYBR Green (iCycler, MyiQ™ Real-Time Detection System, BioRad) with primers listed in the Supplementary Table S1. Two pairs of primers were used: 1) amplifying the 210 bp fragment of 12S rRNA gene region (nucleotides 1095–1305 in mtDNA) not touched by the KSS deletion as a value showing all mtDNA molecules, and 2) amplifying the 164 bp fragment of the deleted region (nucleotides 11 614–11 778) as a value

showing WT mtDNA molecules. All reactions were performed in a 20 µl volume in triplicates. PCR using water instead of template was used as a negative control. PCR was performed by initial denaturation at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 60°C and 30 s at 72°C. Specificity was verified by melting curve analysis and gel electrophoresis. The threshold cycle (Ct) values of each sample were used in the post-PCR data analysis by MyiQ™ software, if only the standard deviation (SD) of triplicate samples was less than 0.2. In each experiment, the absolute amounts of the PCR product were determined by using in parallel the serial dilutions of known amounts of linearized plasmid DNA (10⁴–10⁷ copies per sample). The KSS heteroplasmy level was calculated using the formula: mutant mtDNA/total mtDNA = 1 – (WT mtDNA/total mtDNA). To evaluate mtDNA content upon transfections with recombinant RNAs, real-time PCR was performed using 12S rRNA gene specific probes for mtDNA and Actin gene-specific ones for nuclear DNA (for sequences of the primers, see Supplementary Table S1).

mtDNA isolation and replication intermediate analysis on 2D native agarose gel

Seven hundred square centimeters of 80%-confluent TSFR cybrids cells was transfected with 70 µg of FD-H RNA, and mitochondria and mtDNA were isolated in 4 days after transfection as described in (42) with small modifications. Cells were disrupted in hypotonic buffer [HEPES (pH 7.8) 20 mM, KCl 5 mM, MgCl₂ 1.5 mM, DTT 2 mM, BSA 1 mg/ml and PMSF 1 mM] using a tight-fitting Dounce homogenizer and immediately mixed with 2.5 × MSH buffer [Mannitol 525 mM, sucrose 175 mM, HEPES (pH 7.8) 20 mM, EDTA 5 mM, BSA 1 mg/ml, DTT 2 mM and PMSF 1 mM]. After several rounds of centrifugation, mitochondria were treated with DNase I (Boehringer Mannheim) at 4°C for 15 min. DNase I activity was inhibited by addition of 15 mM EDTA, mitochondria were washed two times with 1 × MSH buffer [Mannitol 210 mM, sucrose 70 mM, HEPES (pH 7.8) 20 mM, EDTA 2 mM, DTT 2 mM and PMSF 1 mM] and purified on sucrose gradient as described (42).

For 2D native agarose gel (2DNAGE), 2 µg of mtDNA was digested by FastDigest BspI enzyme following manufacturer's recommendations (Fermentas). Cleavage sites are referred in the following list (co-ordinates/fragment length, bp): 788–1093/306; 1094–1248/155; 1249–4533/3285; 4534–5646/1113; 5647–5699/53 and 5700–787/11 657 (WT mtDNA) or 4583 (KSS mtDNA). Neutral 2D-AGE was performed by the standard method and run on 0.5% agarose gel for the first dimension and on 1% agarose gel containing 0.5 µg/ml EtBr for the second dimension, as described (43,44). Blots were hybridized with radiolabeled PCR fragment (nucleotides 8099–8365/15438–15931 of mutant KSS mtDNA), exposed to PhosphorImager screen, revealed by Typhoon-Trio (GE Healthcare) and analyzed by ImageQuantTL software (GE Healthcare).

Recombinant RNA modeling

To predict secondary structures of recombinant RNA molecules and estimate their free energy (dG), the 'Mfold' program was used (45,46); 5S rRNA variants secondary structures were corrected in accordance with data published (47,48). To estimate melting temperatures for DNA–DNA and RNA–DNA duplexes, we used IDT Sci-Tools OligoAnalyser 3.1 software (49). Specific hybridization with target mtDNA was tested using Southern-blot hybridization of WT and KSS double-stranded replication templates (see earlier), corresponding plasmids and mtDNA fragments with 32 P-labeled recombinant RNAs in $1 \times$ PBS at 37°C.

In vivo mitochondrial translation

Analysis of mitochondrial protein synthesis was performed as described previously (22) with minor modifications. Briefly, 600×10^3 cells were incubated for 10 min in DMEM w/o methionine (Sigma) in the presence of 100 μ g/ml of emetine to block cytoplasmic translation, followed by 30 min with 200 μ Ci/ml [35 S]-methionine (Amersham) and, finally, 10 min chase in the normal growth medium. Cells were solubilized in a Laemmli's buffer, sonicated for 5 s to break cellular DNA, incubated for 10 min at 37°C and 100 μ g of protein was run on a 10–20% gradient SDS-PAGE. Protein amounts loaded were before normalized by anti-tubulin and anti-porin immunoblotting of the same preparations. Visualization and quantification were performed using Typhoon-Trio and ImageQuantTL software (GE Healthcare).

RESULTS

Design of RNA-based mitochondrial vectors

To test the anti-genomic strategy (Figure 2A), we used as a model mtDNA containing a large deletion (nucleotides 8363–15438) underlying a case of a frequent mitochondrial pathology, the KSS (Figure 1A). The deletion in mtDNA generates a new sequence at the fusion of the deletion boundaries, further referred to as KSS-DNA, which can serve as the target for the anti-genomic RNAs. To use 5S rRNA and FD-RNA as mitochondrial vectors, the distal portion of the β -domain of 5S rRNA (Figure 1B) and the linker part between hairpin domains in FD-RNA (Figure 1C) were replaced by sequences corresponding to either H- or L-strand of KSS-DNA (referred to as 5S-H and 5S-L or FD-H and FD-L correspondingly). The choice of the insert length was driven by secondary structure and melting temperature prediction (Table 1 and Supplementary Figure S1). To avoid formation of stable alternative structures for FD-RNA-L, carrying the longest insertion of 22 bases, a C to G mismatch was introduced (Figure S1), resulting in comparable predicted melting temperature for hybrids between the recombinant RNAs and mutant KSS mtDNA (Table 1). According to T_m predictions, annealing of recombinant RNAs to WT mtDNA should be negligible at 37°. To validate the selected versions experimentally, we hybridized labeled recombinant RNAs with

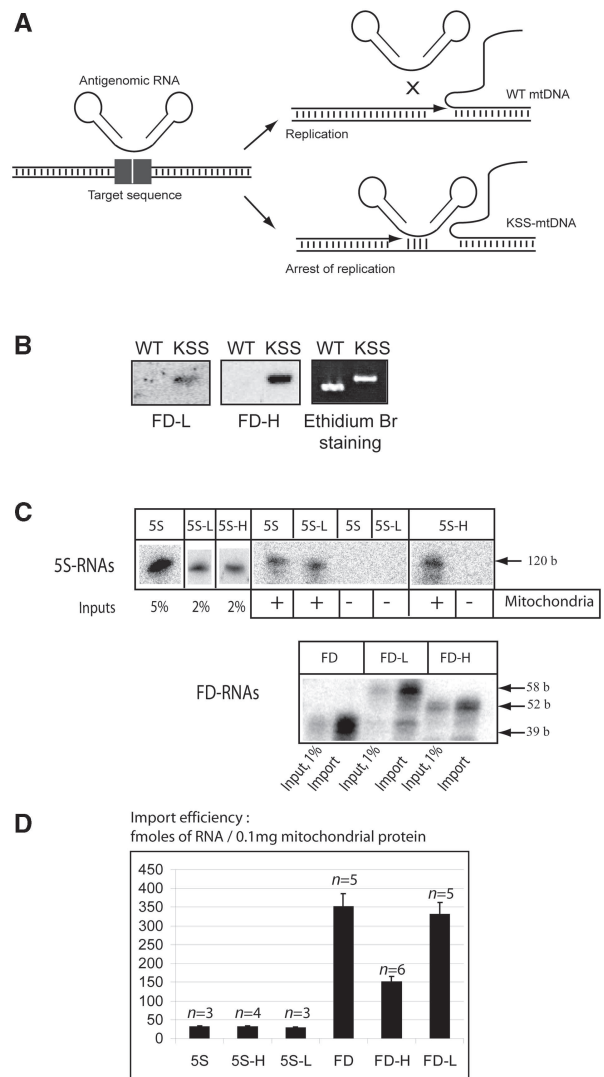


Figure 2. (A) Scheme of the anti-genomic strategy. (B) Southern hybridization of wild-type or KSS mtDNA fragments with labeled recombinant RNAs (FD-L and FD-H) at 37°C. (C) *In vitro* import of the recombinant RNAs. Autoradiography of isolated from purified mitochondria RNA separated in denaturing 10% PAAG is presented; 5S rRNA derived molecules above and FD-RNA derived ones below. The size of RNA molecules is shown at the right. 'Input', 1–5% of RNA used for each assay, representing 30–150 fmoles of labeled RNA. Mitochondria (+) corresponds to the import assay, Mitochondria (–) to the mock import assay without mitochondria, used as a control for non-specific protein–RNA aggregation. (D) The import efficiencies, expressed in fmoles of protected RNA to 0.1 mg of mitochondrial protein, as described elsewhere (32); *n*, number of independent experiments; *n* = 3–6, as detailed upon each graph.

mtDNA fragments under physiological conditions, demonstrating specific annealing with the mutant (KSS) but not with WT mtDNA (Figure 2A and B and Supplementary Figure S2).

All the recombinant RNAs were tested for their import into isolated human mitochondria as described in (26). It was observed that the insertion sequences did not affect the capacity of RNA molecules to be internalized by mitochondria (Figure 2B). Mitochondrial targeting of

Table 1. Melting temperatures prediction for hybrids between the recombinant RNAs and mutant or wild-type mtDNA regions (SD = 1.3°C, “b”, bases)

RNA	Homology with KSS mtDNA	T_m for KSS mtDNA	Homology with wt mtDNA (5'-deletion boundary)	T_m for 5'-deletion boundary	Homology with wt mtDNA (3'-deletion boundary)	T_m for 3'-deletion boundary
5S-H	15 b	52.1°C	8 b	18.2°C	8 b	28.1°C
5S-L	14 b	45.2°C	7 b	16.1°C	8 b	16.6°C
FD-H	15 b	52.1°C	9 b	24.2°C	7 b	21.9°C
FD-L	21 b (1 mismatch)	51.4°C	12 b	34.4°C	10 b (1 mismatch)	27.7°C

FD-H RNA revealed to be less important compared to FD-L and FD RNAs, however, still rather efficient. This can be explained by a possibility of an alternative secondary structure for this RNA, missing the D stem-loop domain and thus less efficient as an import substrate (Supplementary Figure S1).

To test whether recombinant RNAs imported into mitochondria are able to interfere with replication of the mutant mtDNA, an *in vitro* replication run-off assay was first established (Supplementary Figure S3), permitting to replicate both strands of mtDNA PCR-amplified fragments. Addition of recombinant RNAs containing KSS-H or KSS-L inserts inhibited replication of KSS-DNA in a dose-dependent manner. In contrast, the presence of the recombinant RNAs did not significantly inhibit replication of WT mtDNA, supporting the above data suggesting that recombinant RNAs can discriminate KSS-DNA from the WT one (Figure 2B). The anti-replicative effect of FD-RNAs was more pronounced than that of 5S-L and 5S-H RNAs and allowed up to 60% inhibition (Supplementary Figure S3). These values are comparable with those previously reported for PNA (11), which indicates that natural RNAs can be as efficient as synthetic PNAs for the anti-genomic strategy.

Transfection of cybrid cells with anti-replicative RNA

To validate the anti-replicative effect of recombinant RNAs *in vivo*, we constructed a transmitochondrial cybrid cell line containing mitochondria from fibroblasts of a patient diagnosed with KSS syndrome. Heteroplasmy level (proportion of mutant KSS mtDNA to all mtDNA molecules) has been analyzed by real-time PCR with primers listed in the Supplementary Table S1. The cybrid cell line obtained was characterized by presence of $65\% \pm 2\%$ of KSS mutation in mtDNA, the level being stable upon more than 3 months of continuous cultivation. The sequence of deletion boundaries was shown to be the same in five independent clones and corresponded to deletion of nucleotides 8363–15438 in mtDNA, as was shown by direct sequencing of the patient's mtDNA (Figure 1A). However, only a very weak ($10\% \pm 2\%$) decrease of oxygen consumption can be detected in cybrid cells (not shown). The same situation was already reported for many other mutations in mtDNA, where the respiration defects detected in patients' muscles and nervous tissues have been prominently decreased and almost not detectable in fibroblasts and cybrid cells (50,51). On the other hand, the absence of strong respiration phenotype facilitated the manipulations with the cultured cells and allowed us to use this cell

line as a model to validate the anti-replicative effect of recombinant RNAs *in vivo*.

Because the *in vitro* anti-replicative effect of FD-RNAs was more pronounced, for the *in vivo* assay, we performed the transient transfection of KSS cybrid cells with FD-L and FD-H RNA. First, the efficiency of transfection was evaluated by FACS using fluorescently labeled FD-H RNA, and it was shown that >95% of cells were transfected (Supplementary Figure S4). Then, cells were transfected with non-labeled FD-RNAs, and amount of RNA internalized by cells was evaluated by Northern hybridization of total cellular RNA comparing with the signals of the known amounts of T7-transcripts loaded on the same gel. By this approach, we could estimate that approximately 15% of RNA added to cells were internalized and can be detected in full-size form 24 h after transfection (not shown). We also measured the degradation ratio of recombinant RNA in cybrid cells at different time points spanning a 10-day period after transfection. Surprisingly, recombinant RNAs were detectable in cybrid cells up to 6 days after transfection, stability of RNAs FD-H and FD-L being slightly more prominent than that of RNA FD (Figure 3A).

Relative efficiency of RNA mitochondrial import was analyzed by Northern hybridization of RNA isolated from purified RNase-treated mitochondria 48 h after cybrid cells transfection with various RNAs (Figure 3B). As a negative control, cells were transfected with a short artificial RNA containing no import determinants (referred to as Control RNA, Figure 3B and Supplementary Figure S5A and B). Contrary to this RNA found not to be associated with mitochondrial fraction, recombinant FD-L and FD-H RNA were even more efficiently imported into mitochondria than FD-RNA without insert (Figure 3B and Supplementary Figure S5B). The quantitative discrepancy between *in vitro* (Figure 2B) and *in vivo* import data can be explained by different RNA folding in cells and, also, by an advantage of more flexible molecules containing linkers between the two structured domains interacting with the protein import factors.

The quantity of recombinant RNAs in the mitochondrial fraction 2 days after transfection (estimated by Northern hybridization comparing to known amounts of corresponding T7-transcripts used as quantitative reference) corresponded to a value of $3.2 \pm 0.5 \times 10^4$ RNA molecules per cell. Comparing these values with mtDNA amount, measured by real-time PCR as $1.0 \pm 0.1 \times 10^3$ molecules per cell, we can estimate the RNA:mtDNA molar ratio *in organello* as 30:1. This estimation validate

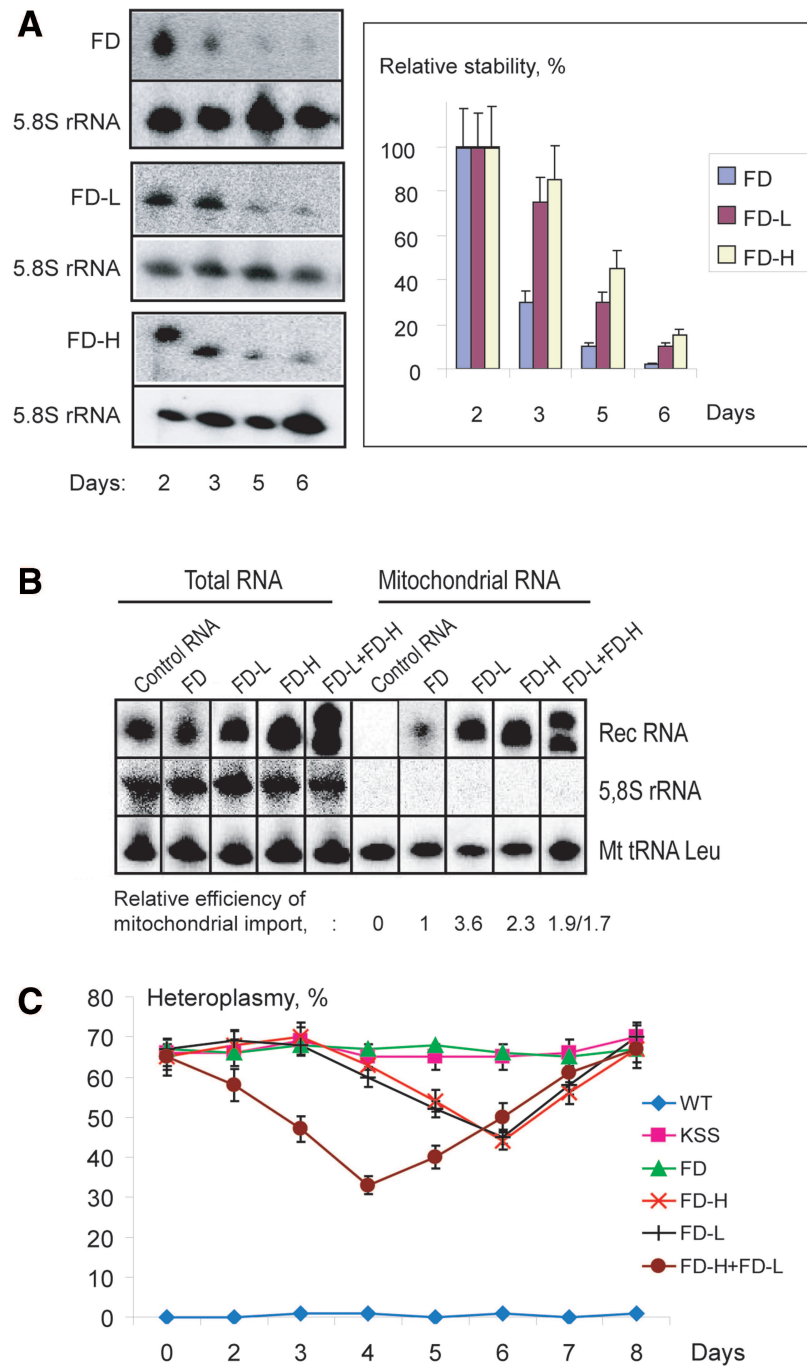


Figure 3. The effect of recombinant RNA mitochondrial targeting on heteroplasmy level in KSS cybrid cells. (A) Recombinant RNA stability in transiently transfected KSS cybrid cells. At the left, an example of Northern hybridization of total RNA isolated in different time after transfection (indicated below) with probes against FD-RNAs used for transfection (FD, FD-L or FD-H) and against 5.8S rRNA to quantify the level of recombinant RNA in the cells. At the right, time dependence of RNA decay, SD is calculated from at least four independent experiments. (B) Mitochondrial import of recombinant FD-RNAs in transiently transfected cybrid cells. Northern hybridizations of RNA extracted from cells or purified mitochondria 48 h after transfection. Above, RNAs used for transfection are indicated; control is an artificial RNA not imported into mitochondria (Supplementary Figure S5A). Relative efficiencies of mitochondrial import are shown below, import of FD-RNA is taken as 1 (\pm SD = 0.1, results of one from three independent experiments are presented). (C) Time dependence of KSS heteroplasmy level upon transient transfection of cybrid cells with various RNA (indicated at the right); KSS, mock-transfected cybrid cells. SD is calculated from three independent experiments.

our strategy, because the same order of recombinant RNA molar excess allowed us to decrease mtDNA replication *in vitro* up to 60% (Supplementary Figure S3).

Transient effect of imported RNAs on mutant mtDNA *in vivo*

Heteroplasmy levels (percentage of mutant KSS mtDNA to all mtDNA molecules) were measured in cybrid cells at different time points spanning a 10-day period after transfection (Figure 3C). We observed a decrease of the proportion of mutant mtDNA by 15–25% in cells transfected by recombinant RNA containing either KSS-DNA-H or KSS-DNA-L inserts but not in mock-transfected ones or cells transfected with FD-RNA (mitochondrially imported but having no homology to the mt-DNA), indicating that mitochondrially imported RNA molecules can function as anti-genomic agents in human cells. Because the effect of the inserts complementary to both mtDNA strands was similar, in the next experiment two recombinant RNA molecules, FD-L and FD-H, were used for transfection simultaneously. Both RNAs were detected in the mitochondria simultaneously in comparable amounts (Figure 3B and Supplementary Figure S5B) and provided the most pronounced decrease of heteroplasmy level by $35\% \pm 2\%$ (Figure 3C).

To ascertain the absence of a non-specific effect on replication that reduced total mtDNA levels in cells, we estimated mtDNA amounts in WT and KSS cybrid cells after transfection with RNAs FD-L and FD-H (Supplementary Figure S6A). Using real-time PCR, we compared ratios between mtDNA (gene 12S rRNA) and nuclear DNA (gene of actin, see Supplementary Table S1). Variations of this ratio, taken as 1 24 h after transfection, did not correlate with the heteroplasmy shift. For WT cells, levels of mtDNA were stable in the range of 10%, comparable to natural fluctuation values, thus indicating that no depletion effect has been caused by adventitious reduction in replication of the WT mtDNA. In KSS cybrid cells, a slight decrease of 25% from initial mtDNA level has been observed, probably due to replication pausing caused by anti-replicative RNAs.

The shift of heteroplasmy in cybrid cells was reproducibly observed with a 4–6 days delay in respect to the cells transfection; however, the initial level was consistently restored within 7–8 days. The temporal character of the effect could be a consequence of the recombinant RNA degradation and/or of the novel mtDNA deletion formation and propagation. The latter suggestion was verified by direct sequencing of mtDNA isolated at different time points after cybrid cells transfection with recombinant RNAs. No heterogeneity of the deletion boundaries was found (Supplementary Figure S6B), proving the absence of other mutant mtDNA molecules that could not be affected by recombinant RNAs.

Taking into account the degradation ratio of recombinant RNA in the cells (Figure 3A), one can suggest that the restoration of heteroplasmy level in 7–8 days after transfection coincides perfectly with the time period when RNA/mtDNA molar ratio should be greatly decreased, being no more detectable by Northern hybridization.

Thus, one can suggest that the stabilization of the heteroplasmy shift could be achieved by stable expression of anti-genomic RNA molecules in the cells.

RNA affects mutant mtDNA replication *in vivo*

To demonstrate that anti-replicative RNA molecules affect mutant mtDNA replication *in vivo*, we used 2DNAGE. This technique separates DNA molecules on the basis of size and shape, thus permitting to detect various types of replication intermediate (RI) in specific and predictable way (42,52). We compared RIs of mtDNA isolated from WT and KSS cybrid cells (Figure 4A), digested with restriction enzyme *BspI*, chosen to separate fragments of different types of mtDNA, as indicated at the Figure 1A. Because of heteroplasmy, after hybridization of digested mtDNA with PCR fragment of Cyt *b* region, we can see one (for WT mtDNA) or two (for KSS mtDNA) main spots, corresponding to DNA fragments of WT and mutant KSS mitochondrial genomes and, therefore, to two sets of RIs (see cartoon interpretation on Figure 4B, panel d).

As it was demonstrated previously (53), mtDNA fragments containing the replication origin O_H produce two types of RIs, bubble arc and simple Y arc, their relative abundance being altered markedly: when larger fragments of mtDNA were studied, the bubble arc signal increased, with a concomitant decrease in signal from the Y arc (illustrated on a scheme above panel d). Analysis of two DNA fragments on the same gel is a rather unusual situation for 2DNAGE approach, therefore RIs corresponding to WT mtDNA fragment are not well separated in our system; however, they correspond perfectly to the predicted pattern (54). We can detect bubble arc-type RI corresponding to WT mtDNA fragment, as well as slow-moving Y arcs, sensitive to S1 nuclease treatment (55,56) (Figure 4A and B). The intermediates of mutant KSS mtDNA replication can be partially masked by WT mtDNA fragment; however, we detected the descending part of a Y arc-type RI and a weak bubble arc, visible upon longer exposition of the blot (not shown).

We compared RIs of mtDNA isolated from KSS cybrid cells at different periods of time after transfection with RNA FD-H (Figure 4B, panels a–c) and, as a control, with a yeast tRNA (tRK1, panels e–g). The patterns of RIs corresponding to WT mtDNA fragment are rather similar in post-transfected cells (Figure 4B) indicating that the replication of WT mtDNA was not significantly altered by recombinant RNA. In contrast, we reproducibly observed a prominent spot on a small Y arc-resembling RI corresponding to the mutant mtDNA fragment 4 days after transfection with RNA FD-H but not immediately after transfection or 8 days later (Figure 4B, panel b, see also Supplementary Figure S7 for two other examples of similar experiments). This kind of spots, caused by a marked increase of RIs around a specific point, had been previously described as mtDNA replication pauses in the sites of specific protein binding (43,44), thus allowing us to suggest that the anti-replicative RNA FD-H enhances replication pausing at the site of its annealing to mutant mtDNA (Figure 4C).

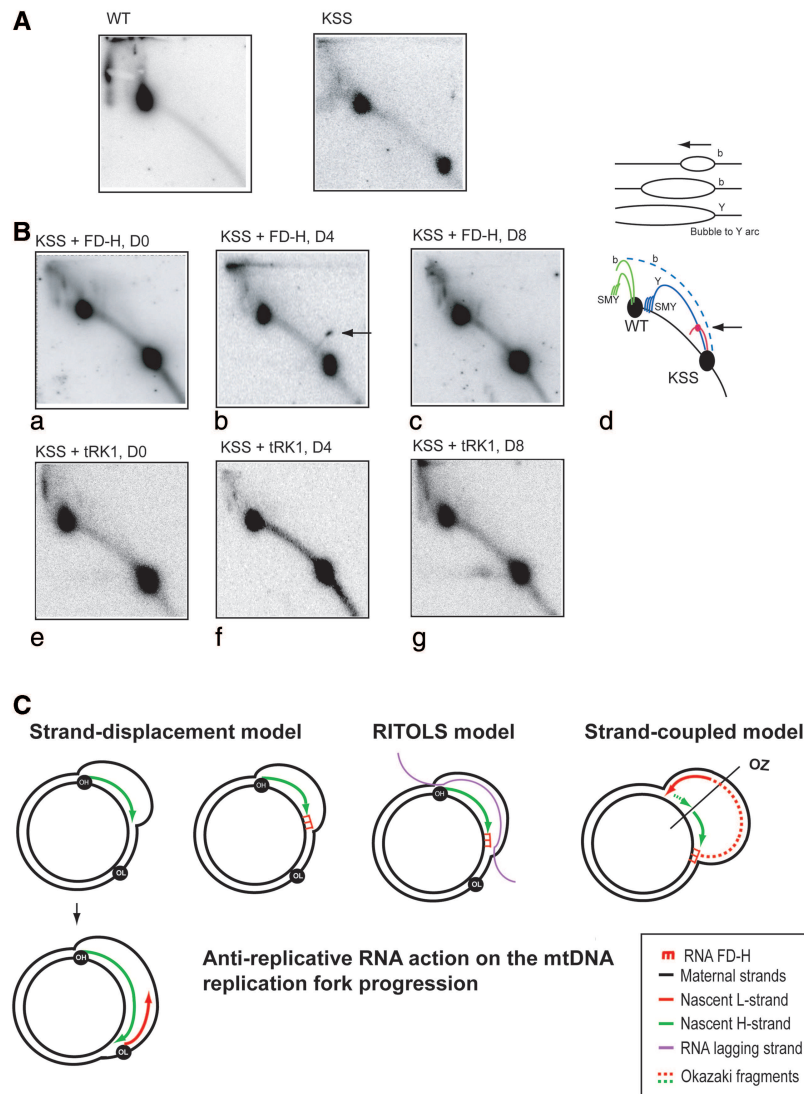


Figure 4. Recombinant RNA affects mutant mtDNA replication *in vivo*. (A) The 2DNAGE electrophoresis analysis of mtDNA isolated from wild-type (WT) and KSS cybrid cells. MtDNA was digested with BlnI, blotted and hybridized with P^{32} labeled fragment of the Cyt b gene (Figure 1A). Radio autographs detect DNA fragment of 11 645bp for wild-type mtDNA and two fragments of 11 645 and 4570 bp for heteroplasmic mtDNA, indicated as WT and KSS on the cartoon at the panel d. (B) The 2DNAGE analysis of mtDNA isolated from KSS cybrid cells in different periods of time after transfection with RNA FD-H (panels a–c) and as a control with yeast tRNA (tRK1, panels e, f and g) immediately after transfection (panels a and e), in 4 days (panels b and f) and in 8 days (panels c and g). Panel d, schematic representation of replication intermediates: in green, replication intermediates corresponding to wild-type mtDNA and in blue, corresponding to mutant mtDNA. b, bubble arcs; Y, y arc; SMY, slow migrating y arcs. The site of presumptive replication pausing is shown by arrow. (C) Schematic representation of three mtDNA replication models (see ‘Discussion’ for details and references) and possible effect of anti-replicative recombinant RNA FD-H. OH, OL and OZ, origins of H-strand, L-strand, and strand-coupled replication, respectively.

The origin of a new RI resembling a small Y arc is still not clear. We can hypothesize that it might be due to increased rate of lagging-strand initiation as proposed in (57). Indeed, a stalled leading H-strand may coincide with the alternative initiation of an L-strand through strand switching of the polymerase, resulting in a set of forks expected to form a Y arc upon 2DNAGE analysis (58).

In non-transfected cells (Figure 4A) or in cells transfected with yeast tRNA^{Lys} in the same conditions, we cannot detect any RIs corresponding to replication pausing (Figure 4B, panels e–g). As mentioned before, yeast tRNA^{Lys} is efficiently imported into human

mitochondria (Supplementary Figure S5B) but does not contain any homology to human mtDNA (Figure 1C) and should not affect its replication. Thus, all our data clearly demonstrate that the recombinant RNA imported into mitochondria *in vivo* leads to a specific replication pause of the mutated mtDNA.

Stable effect of imported RNAs on mutant mtDNA *in vivo*

Because all our attempts to express FD-RNA in the cybrid cells in stable manner under the control of external

promoters were unsuccessful, we used another set of recombinant RNA molecules based on 5S rRNA, one of which was previously shown to be expressed, correctly matured and mitochondrially targeted in human cells (31). Recombinant 5S rRNA genes (Figure 1B) were cloned into a phagemid vector in the context optimal for correct transcript processing, as described previously (31), and used for a stable transfection of KSS cybrid cells. Transfectants selected for their resistance to appropriate antibiotic were cloned. Approximately 20–25 individual clones of each series—containing the empty vector, WT or recombinant 5S rRNA genes—were characterized by similar growth rates, suggesting the absence of toxic effect of the transgenes expression.

The KSS mutation heteroplasmy level was analyzed in each clone. Control cell lines (mock-transfection, transfection with the empty vector or with the vector containing the WT 5S rRNA gene) generated clones with little variations of heteroplasmy (Figure 5A), whereas for cells transfected with 5S-L and 5S-H RNA genes, the occurrence of 30% clones with decreased proportion of mutant mtDNA was observed (Figure 5A). The lower heteroplasmy levels found in these clones (51–54% for cells containing 5S-L gene and 37–52% for those containing 5S-H gene) were then stable during 3 months of continuous cultivation (Figure 5B and C).

To test the effect of the simultaneous expression of both 5S-L and 5S-H RNAs, the cell line derived from the clone 5S-H2, characterized by the lowest heteroplasmy level ($37\% \pm 2\%$), was transiently transfected with plasmid containing the 5S-L gene. The resulting cell line, referred to as 5S-H2+5S-L, was characterized by an additional shift of the heteroplasmy, from $37\% \pm 2\%$ to $30\% \pm 2\%$ of mutated mtDNA molecules (Figure 5B). Expression of both recombinant 5S rRNA molecules in this cell line was confirmed by RT-PCR analysis with insert-specific primers (Supplementary Figure S8A). Mitochondrial import of recombinant 5S rRNAs was detected in all the clones expressing 5S-L or 5S-H RNA by RT-PCR with RNA isolated from purified mitochondria devoid of cytosolic contaminants (Supplementary Figure S8B).

The level of recombinant 5S rRNA expression in the clone 5S-H2 was estimated as 30 ± 5 molecules per cell using semi-quantitative RT-PCR (Supplementary Figure S8C). This very low expression is not surprising taking into account the competition of mutant 5S rRNA with much more abundant WT 5S rRNA molecules for interaction with protein factors of transcription, processing and export from the nucleus. In the same cell line, 8 ± 2 molecules of recombinant 5S rRNA per cell were found inside the mitochondria (Supplementary Figure S8C), indicating the very high efficiency of import (25%), as it was shown previously. This value is certainly under-estimated, because a significant part of mitochondrial RNA has been usually degraded during the mitochondria isolation and purification (see Supplementary Figure S5B and ‘Materials and Methods’ section).

Because the respiration phenotype of KSS cells can be hardly detectable, we used the assay of mitochondrial

protein synthesis to compare WT cells, KSS cybrid cells and a clone of KSS cells expressing recombinant 5S rRNA (5S-H2) (Figure 5D and E). Cybrid cells were characterized by the ~25% decrease of total mitochondrial translation. As expected, the synthesis of proteins encoded by the portion of mtDNA deleted in KSS mutants (Figure 1A) was affected in a more prominent way, the ratio between Cyt b and Cox1 proteins being twice lower in cybrid cells comparing to control cell line. Remarkably, in the clone 5S-H2, the total level of translation and the Cyt b synthesis were partially restored (Figure 5D and E). For Cox3 protein, a prominent decrease in KSS cybrid cells and re-increase in the clone 5S-H2 (Figure 5E) have also been observed.

The results obtained should be considered as a promising indication on the possibility to obtain a curative effect on the mitochondrial dysfunction by a heteroplasmy shift. So far, one cannot exclude that selected individual clones can have a slightly varying nuclear background issued from the transfection procedure. To explore this possibility, we analyzed individual subclones of the 5S-H2 cell lines after prolonged cultivation and subsequent cloning. As mentioned earlier, this transgenic line was stable during 3-month-long cultivation; however, upon additional 6-week cultivation and subsequent recloning, one among >100 individual subclones retaining the resistance to G418 was characterized by a spontaneous loss of 5S-H expression (as demonstrated by PCR and RT-PCR, Supplementary Figure S8A and D). This derivant cell line, designed as 5S-H2ko, was analyzed for mitochondrial translation by pulse-chase assay (Figure 5D and E). It was indeed observed that the effect of improved mitochondrial translation found in the original 5S-H2 cell line was lost, and the ratio of mitochondrially synthesized polypeptides in 5S-H2ko line was nearly identical to that of the initial KSS cybrid cell line. This result indicates that the curative effect observed in 5S-H2 line was due to the presence and, most probably, mitochondrial import of the recombinant 5S rRNA.

In conclusion, a weak but stable expression and mitochondrial import of the recombinant 5S rRNAs in KSS cybrid cells allowed us to obtain cell lines characterized by a stable shift of mitochondrial heteroplasmy level accompanied, for the best expressor, by an improvement of mitochondrial translation.

DISCUSSION

RNA import pathway as a therapeutic tool

Mutations in mtDNA have been associated with a wide variety of human disorders (1). Many patients suffering from mtDNA defects harbor subpopulations of mutated and WT mtDNA molecules within the same cell and tissue, a state known as heteroplasmy (14,59). Because there is no effective treatment for these often devastating pathologies, one attractive approach would be to specifically target mutant mtDNA to prevent it from replicating, thereby allowing propagation of only WT genomes. Application of such an ‘anti-genomic,’

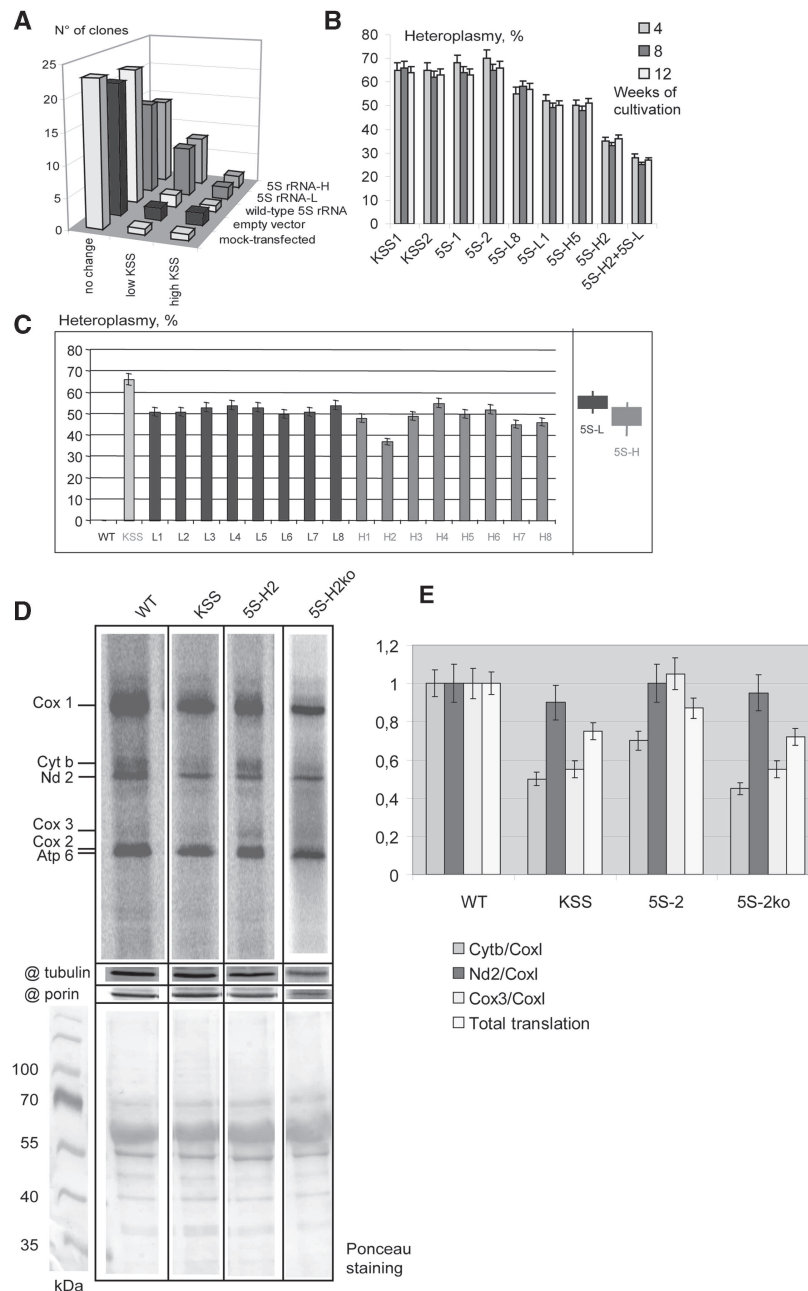


Figure 5. Analysis of clones obtained after stable transfection of KSS cybrid cells with 5S rRNA genes. **(A)** Heteroplasmy variations in series of clones of KSS cybrid cells after stable transfection with 5S rRNA genes (indicated at the right). ‘No change,’ number of clones where the heteroplasmy shifts were comparable to natural fluctuation values (0–5%); ‘low KSS,’ the proportion of KSS mtDNA reduced by >10% and ‘high KSS,’ the proportion of KSS deletion increased by >10%. **(B)** Stability of the heteroplasmy level in individual clones. Two clones of each series are presented: KSS, mock-transfected KSS cybrid cells, clones from ‘no change’ set; 5S, cells transfected with the wild-type 5S rRNA gene, clones from ‘no change’ set are presented; 5S-H and 5S-L, cells transfected with corresponding recombinant 5S rRNA genes, clones from ‘low KSS’ series, see also (C); 5S-H2+5S-L, clone 5S-H2 transfected with 5S-RNA-L gene. **(C)** Analysis of heteroplasmy levels in individual clones. All clones resulting from transfection with 5S-L and 5S-R RNAs where the heteroplasmy shift was >10% are presented, number of independent qPCR measurements $n = 3$. An example of such an assay, demonstrating that the shifts observed were significant and cannot be explained by errors of qPCR, is given in the [Supplementary Figure S9](#). At the right, the summary of heteroplasmy shifts induced by 5S-L and 5S-H RNA is presented. **(D)** Analysis of mitochondrial protein synthesis in wild type, KSS cybrid cells, a clone of KSS cells expressing recombinant 5S rRNA (5S-H2) and the derivant of the same cell line after the loss of recombinant 5S rRNA expression (5S-H2ko), as indicated above the panel. Autoradiography of SDS-PAGE is demonstrated, products of mitochondrial translation are indicated at the left. @ tubulin and @ porin, immunoblotting of the same preparations, using as a loading control. The lower panel represents Ponceau S staining of the corresponding membrane. **(E)** The graphs represent the total level of mitochondrial translation (normalized to the amount of mitochondrial porin) and the ratio of signals corresponding to individual proteins. Cytb and Cox3, cytochrome b and subunit 3 of cytochrome oxidase, proteins encoded by the portion of mtDNA deleted in KSS mutants; CoxI and Nd2, subunit 1 of Cytochrom oxidase and subunit 2 of NADH-dehydrogenase complexes, the both proteins encoded by the mtDNA region not touched by the KSS deletion.

or 'anti-replicative', strategy is confronted to two main problems: facilitating the translocation of the anti-genomic oligomers through the double mitochondrial membrane and allowing their access and specific binding to mutated region of mtDNA. To resolve the first problem, the natural pathway of RNA import into yeast and human mitochondria can be useful. Our recent studies permitted to identify the import determinants in tRNA and 5S rRNA structures, and a set of small RNA molecules with significantly improved efficiency of import into human mitochondria was designed on this basis (31,32). In this study, to create a vector system able to target 'therapeutic' oligonucleotides into deficient human mitochondria, we inserted into these RNAs short (14–21 bases) sequences corresponding to the boundaries of a large deletion in mtDNA associated with a neuromuscular syndrome KSS. All the recombinant RNAs so obtained were proven to retain their capacity to be internalized by human mitochondria *in vitro* (in isolated human mitochondria) and *in vivo* (in cultured cybrid cells). These data indicate that the pathway of RNA import into mitochondria can serve for targeting anti-replicative oligoribonucleotides into mitochondrial matrix.

The second problem consists in specific binding of the anti-replicative oligonucleotides to mutated region of mtDNA. In a previously published study (11,60), synthetic PNAs were used to increase, comparing to oligodeoxynucleotides, the selective and stable binding to the region of mtDNA around the mutation site. However, RNA–DNA duplexes are considered to be, in general, more stable than DNA–DNA ones (49), so the stretch of ribonucleotides could target the mtDNA duplex, especially in the region of the replication machinery progression, where it is already at least partially destroyed by the helicases. Our *in vitro* replication assay showed that, indeed, specific oligoribonucleotides interfere with mtDNA replication, reducing it to the level comparable with that described for PNA. Therefore, RNA molecules having an important advantage as natural mitochondrial import substrates were also suitable for selective inhibition of mutant mtDNA replication *in vitro*.

Anti-replicative RNA action *in vivo*

The mechanism of human mtDNA replication is still a subject of intense debate (61–63). The idea of anti-replicative heteroplasmy shift as a therapeutic strategy (11) was initially based on the strand-displacement mtDNA replication model that suggested the existence long single-stranded RIs (64). According to this model, leading-strand (H, heavy strand) synthesis starts at a fixed point (O_H) and advances approximately two-thirds of the way around the molecule before second-strand (L, light strand) synthesis is initiated (Figure 4C). More recently, another two classes of RIs were described in mammalian mitochondria. Detection of RNA–DNA hybrid intermediates of mtDNA replication gave rise to a model involving Ribonucleotide Incorporation Throughout the Lagging Strand (RITOLS) (55,56). This model shares many features with the strand-displacement one, the main difference consisting in the presence of displaced H-strand

not in a single-stranded form covered by SSB protein but in the form of RNA–DNA hybrid, where the lagging strand RNA may be created by primase or by a nascent RNA transcript hybridizing with the displaced H-strand in the 3'–5' direction (55).

Another type of RIs, DNA–DNA duplexes, especially predominant in cultured human cells recovering from mtDNA depletion, has been proposed as compatible with the products of conventional strand-coupled DNA synthesis, initiating from sites dispersed across the broad zone named ori Z (52,53). Alternatively, these DNA–DNA duplexes could be considered as a consequence of frequent initiation of lagging-strand DNA synthesis resulting in an increased rate of conversion of RITOLS RIs to dsDNA ones (57,58).

According to the scheme shown at Figure 4C, for all the three current models of mtDNA replication, mitochondrially imported anti-replicative RNA should cause a replication stalling at the site of RNA annealing to the mutant mtDNA due to impairing of the replication fork progression. The similar mechanism has been proposed to explain the replication forks arrest in the D-loop region, namely due to the inability of the replisome helicase to separate regions of short RNA–DNA hybrid (53). In full agreement with our expectations, analysis of mtDNA RIs on the 2DNAGE revealed a clear site of replication pausing detectable only on the fragment of mutant KSS mtDNA isolated from cells transfected with recombinant RNA FD-H (Figure 4B). This is a direct demonstration of recombinant RNA ability to stall the mutant mtDNA replication *in vivo*.

Effect of imported RNAs on mtDNA heteroplasmy

To test the anti-replicative RNA efficiency in human cells, the changes of heteroplasmy level in KSS transmitochondrial cybrid cells were measured upon the presence of recombinant RNAs in mitochondria. Two different strategies were used. First, cells were transiently transfected with small artificial RNA molecules containing structural determinants of mitochondrial import and 15–21 bases insertions complementary to the region of mtDNA around the KSS deletion site. Our data show that this approach allows targeting a rather high level of recombinant RNA inside the mitochondria, and this reproducibly coincides with a shift of KSS mtDNA heteroplasmy level from 65% to 40–50%, detected within the 4–6 days period after transfection. This change of heteroplasmy, if stable, should be enough to rescue phenotypic defects of oxidative phosphorylation (59,65). However, the restoration of the initial 65% of mutant mtDNA in 7–8 days was consistently observed, most probably being a consequence of the recombinant RNA degradation, followed by accelerated replication of shorter mutant mtDNA molecules due to the previously hypothesized effect of 'replicative advantage of deleted mtDNA' (65,66).

To check whether the permanent presence of recombinant RNA in human cybrid cells would lead to a more stable effect on the heteroplasmy, another strategy was used, consisting in a stable expression of 5S

rRNA-based recombinant RNA genes. This approach appeared to have also some inconvenient features, because the expression of recombinant 5S rRNA genes was relatively weak, detectable by RT-PCR only, which can be explained by competition with more than 200 naturally present 5S rRNA genes for the transcription and nuclear export protein factors. A variation in the recombinant RNA expression in different clones led to various effects on the heteroplasmy level—no changes were detected in 70% of clones, and only in 8 from 25 clones of each series the shift of KSS mtDNA heteroplasmy level from 65% to 37–54% was observed. On the other hand, this strategy provided a heteroplasmy shift stable during several weeks of cells cultivation, which is a first successful attempt to change the proportion of mutant mtDNA in living cells by exploiting RNA import.

In our previous study, we have shown that 5S rRNA molecules with substitution of the helix III and loop C (Figure 1B) by a heterologic sequence can be imported into isolated human mitochondria (which was confirmed also in this study, Figure 2A), but had been imported *in vivo* 20 fold more efficiently than the WT 5S rRNA, probably due to the absence of competition between mitochondrial import factors and the ribosomal protein L5 for binding to a mutant 5S rRNA (31). This finding has been confirmed in this study, because at least 25% of recombinant 5S rRNA internalized by cells has been found in purified mitochondrial fraction (Supplementary Figure S8C). Nevertheless, the amount of stably expressed recombinant 5S rRNA was almost 1000-fold lower than in cells transiently transfected with recombinant FD-RNAs. Surprisingly, this weak but stable expression of the recombinant 5S rRNA was sufficient for a shift of mitochondrial heteroplasmy level (Figure 5). We can hypothesize that the persistent presence of even small amounts of anti-replicative 5S rRNA in mitochondria might have an effect on the mutant mtDNA comparable with that of more abundant but rapidly degradable small FD-RNA.

Most part of pathogenic mutations in mtDNA lead to the manifestation of biochemical and clinical defects only when a threshold level of heteroplasmy has been reached. This level may be different not only for different mutations but also for the same mutation in various tissues (2). Normally, phenotypic effect of mtDNA mutation is much more prominent in muscles and nervous tissues than in fibroblasts (50,67). This was exactly the case of KSS deletion, for which low values (below or at the 5% of normal) for cytochrome c oxidase (complex IV) activity and for the ratios of complex I, III or IV activity to either citrate synthase or complex II in patient's muscles containing 72% mutant mtDNA has been shown. However, cybrid cells containing 65% mutant mtDNA, generated and used in this study, were characterized by a very low ($10\% \pm 2\%$) decrease of oxygen consumption comparing to control 143B cell line. Thus, this is not surprising that the mitochondrial translation was only slightly affected (25% decrease in KSS cybrids). We can hypothesize that in cybrid cells, normal mtDNA (which is present in proportion 1:3 to mutant molecules) supports the level of mt tRNA expression sufficient for almost normal mitochondrial translation. Nevertheless, our data show that a stable

shift of heteroplasmy can result in partial restoration of specific mitochondrial translation defects found in KSS cybrid cells (Figure 5E).

Both strategies described here for cultured human cells can be developed as a potential basis for therapy of mitochondrial diseases. Stable expression of 5S-based recombinant RNA in cells should be optimized to give more pronounced effects on the heteroplasmy. Transient transfection approach also appears to be an interesting perspective, because it represents not genetic but rather pharmacological intervention, which can give positive results if the way to stabilize the effect of anti-replicative agents could be found.

To summarize, we demonstrate here for the first time that the replication of mtDNA containing a known pathogenic mutation may be specifically affected by RNA molecules bearing oligonucleotide stretches complementary to the mutant region and that these molecules may be targeted into human mitochondria using artificially engineered RNA based on 5S rRNA or tRNA as vectors. Although the inhibitory effect was partial (15–35% decrease of mutated mtDNA level), it may have a long-term therapeutic interest, because only high levels of mutations in human mtDNA become pathogenic.

SUPPLEMENTARY DATA

Supplementary Data are available at NAR Online: Supplementary Table 1 and Supplementary Figures 1–9.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to E. Shoubridge (Montreal Institute of Neurology) for providing the rho0 143B cell line, to F. Monneaux and F. Gros (IBMC, Strasbourg) for FACS analysis, to M. Vysokikh (Strasbourg) for cell respiration measurement and to J. Holt and A. Reyes (Cambridge, UK) for detailed protocol of mtDNA isolation and helpful advices concerning 2DNAGE.

FUNDING

CNRS (Centre National de Recherche Scientifique); University of Strasbourg; AFM (Association Française contre les Myopathies); ANR (Agence Nationale de la Recherche); FRM (Fondation pour la Recherche Médicale); ARCUS/Suprachim collaboration program; LIA collaboration program (ARNmitocure); National Program 'Investissement d'Avenir' (Labex MitoCross); FRM and AFM PhD fellowships (to Y.T.). Funding for open access charge: Institutional budget (Strasbourg University & CNRS).

Conflict of interest statement. None declared.

REFERENCES

- Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J.C., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P. and Wallace, D.C. (2007) An enhanced MITOMAP with a global

- mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.*, **35**, D823–D828.
2. Wallace, D.C. (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science*, **283**, 1482–1488.
 3. Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Mireau, H., Fox, T.D., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (2000) Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science*, **289**, 1931–1933.
 4. Mahata, B., Mukherjee, S., Mishra, S., Bandyopadhyay, A. and Adhya, S. (2006) Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells. *Science*, **314**, 471–474.
 5. Manfredi, G., Fu, J., Ojaimi, J., Sadlock, J.E., Kwong, J.Q., Guy, J. and Schon, E.A. (2002) Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nat. Genet.*, **30**, 394–399.
 6. Karicheva, O.Z., Kolesnikova, O.A., Schirtz, T., Vysokikh, M.Y., Mager-Heckel, A.M., Lombes, A., Boucheham, A., Krashennnikov, I.A., Martin, R.P., Entelis, N. *et al.* (2011) Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 8173–8186.
 7. Wang, G., Shimada, E., Zhang, J., Hong, J.S., Smith, G.M., Teitell, M.A. and Koehler, C.M. (2012) Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **109**, 4840–4845.
 8. Bacman, S.R., Williams, S.L., Garcia, S. and Moraes, C.T. (2010) Organ-specific shifts in mtDNA heteroplasmy following systemic delivery of a mitochondria-targeted restriction endonuclease. *Gene Ther.*, **17**, 713–720.
 9. Bacman, S.R., Williams, S.L., Hernandez, D. and Moraes, C.T. (2007) Modulating mtDNA heteroplasmy by mitochondria-targeted restriction endonucleases in a ‘differential multiple cleavage-site’ model. *Gene Ther.*, **14**, 1309–1318.
 10. Minczuk, M., Papworth, M.A., Miller, J.C., Murphy, M.P. and Klug, A. (2008) Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.*, **36**, 3926–3938.
 11. Taylor, R.W., Chinnery, P.F., Turnbull, D.M. and Lightowlers, R.N. (1997) Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication *in vitro* by peptide nucleic acids. *Nat. Genet.*, **15**, 212–215.
 12. Chinnery, P.F., Taylor, R.W., Diekert, K., Lill, R., Turnbull, D.M. and Lightowlers, R.N. (1999) Peptide nucleic acid delivery to human mitochondria. *Gene Ther.*, **6**, 1919–1928.
 13. Muratovska, A., Lightowlers, R.N., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Smith, R.A., Wilce, J.A., Martin, S.W. and Murphy, M.P. (2001) Targeting peptide nucleic acid (PNA) oligomers to mitochondria within cells by conjugation to lipophilic cations: implications for mitochondrial DNA replication, expression and disease. *Nucleic Acids Res.*, **29**, 1852–1863.
 14. Smith, P.M. and Lightowlers, R.N. (2010) Altering the balance between healthy and mutated mitochondrial DNA. *J. Inherit. Metab. Dis.*, **34**, 309–313.
 15. Salinas, T., Duchene, A.M. and Marechal-Drouard, L. (2008) Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends Biochem. Sci.*, **33**, 320–329.
 16. Schneider, A. (2011) Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation. *Annu. Rev. Biochem.*, **80**, 1033–1053.
 17. Sieber, F., Duchene, A.M. and Marechal-Drouard, L. (2011) Mitochondrial RNA import: from diversity of natural mechanisms to potential applications. *Int. Rev. Cell. Mol. Biol.*, **287**, 145–190.
 18. Mercer, T.R., Neph, S., Dinger, M.E., Crawford, J., Smith, M.A., Shearwood, A.M., Haugen, E., Bracken, C.P., Rackham, O., Stamatoyannopoulos, J.A. *et al.* (2011) The human mitochondrial transcriptome. *Cell*, **146**, 645–658.
 19. Kren, B.T., Wong, P.Y., Sarver, A., Zhang, X., Zeng, Y. and Steer, C.J. (2009) MicroRNAs identified in highly purified liver-derived mitochondria may play a role in apoptosis. *RNA Biol.*, **6**, 65–72.
 20. Barrey, E., Saint-Auret, G., Bonnamy, B., Damas, D., Boyer, O. and Gidrol, X. (2011) Pre-microRNA and mature microRNA in human mitochondria. *PLoS One*, **6**, e20220.
 21. Bandiera, S., Ruberg, S., Girard, M., Cagnard, N., Hanein, S., Chretien, D., Munnich, A., Lyonnet, S. and Henrion-Caude, A. (2011) Nuclear outsourcing of RNA interference components to human mitochondria. *PLoS One*, **6**, e20746.
 22. Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Jacquin-Becker, C., Goltzene, F., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., Lightowlers, R.N., Martin, R.P. and Tarassov, I. (2004) Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2519–2534.
 23. Rubio, M.A., Rinehart, J.J., Krett, B., Duvezin-Caubet, S., Reichert, A.S., Soll, D. and Alfonzo, J.D. (2008) Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 9186–9191.
 24. Puranam, R.S. and Attardi, G. (2001) The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 548–561.
 25. Wang, G., Chen, H.W., Oktay, Y., Zhang, J., Allen, E.L., Smith, G.M., Fan, K.C., Hong, J.S., French, S.W., McCaffery, J.M. *et al.* (2010) PNPase Regulates RNA Import into Mitochondria. *Cell*, **142**, 456–467.
 26. Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Dogan, S., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (2001) 5 S rRNA and tRNA Import into Human Mitochondria. Comparison of *in vitro* requirements. *J. Biol. Chem.*, **276**, 45642–45653.
 27. Magalhaes, P.J., Andreu, A.L. and Schon, E.A. (1998) Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 2375–2382.
 28. Yoshionari, S., Koike, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Ueda, T., Miura, K. and Watanabe, K. (1994) Existence of nuclear-encoded 5S-rRNA in bovine mitochondria. *FEBS Lett.*, **338**, 137–142.
 29. Smirnov, A., Comte, C., Mager-Heckel, A.M., Addis, V., Krashennnikov, I.A., Martin, R.P., Entelis, N. and Tarassov, I. (2010) Mitochondrial enzyme rhodanese is essential for 5 S ribosomal RNA import into human mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **285**, 30792–30803.
 30. Smirnov, A., Entelis, N., Martin, R.P. and Tarassov, I. (2011) Biological significance of 5S rRNA import into human mitochondria: role of ribosomal protein MRP-L18. *Genes Dev.*, **25**, 1289–1305.
 31. Smirnov, A., Tarassov, I., Mager-Heckel, A.M., Letzelter, M., Martin, R.P., Krashennnikov, I.A. and Entelis, N. (2008) Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria. *RNA*, **14**, 749–759.
 32. Kolesnikova, O., Kazakova, H., Comte, C., Steinberg, S., Kamenski, P., Martin, R.P., Tarassov, I. and Entelis, N. (2010) Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria. *RNA*, **16**, 926–941.
 33. King, M.P. and Attardi, G. (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, **246**, 500–503.
 34. Mager-Heckel, A.M., Entelis, N., Brandina, I., Kamenski, P., Krashennnikov, I.A., Martin, R.P. and Tarassov, I. (2007) The analysis of tRNA import into mammalian mitochondria. *Methods Mol. Biol.*, **372**, 235–253.
 35. Srere, P.A. (1965) Spectral evidence for complex formation between oxaloacetate and citrate-condensing enzyme. *Biochim. Biophys. Acta*, **99**, 197–200.
 36. Kern, D., Dietrich, A., Fasiolo, F., Renaud, M., Giege, R. and Ebel, J.P. (1977) The yeast aminoacyl-tRNA synthetases. Methodology for their complete or partial purification and comparison of their relative activities under various extraction conditions. *Biochimie*, **59**, 453–462.
 37. Entelis, N.S., Krashennnikov, I.A., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (1996) Mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA (Lys): possible roles of aminoacylation and modified nucleosides in subcellular partitioning. *FEBS Lett.*, **384**, 38–42.

38. Kun,E., Kirsten,E. and Piper,W.N. (1979) Stabilization of mitochondrial functions with digitonin. *Methods Enzymol.*, **55**, 115–118.
39. Wong,T.W. and Clayton,D.A. (1985) *In vitro* replication of human mitochondrial DNA: accurate initiation at the origin of light-strand synthesis. *Cell*, **42**, 951–958.
40. Wong,T.W. and Clayton,D.A. (1985) Isolation and characterization of a DNA primase from human mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **260**, 11530–11535.
41. Kohrer,C., Xie,L., Kellerer,S., Varshney,U. and RajBhandary,U.L. (2001) Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells: a general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **98**, 14310–14315.
42. Reyes,A., Yasukawa,T. and Holt,I.J. (2007) Analysis of replicating mitochondrial DNA by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.*, **372**, 219–232.
43. Hyvarinen,A.K., Pohjoismaki,J.L., Reyes,A., Wanrooij,S., Yasukawa,T., Karhunen,P.J., Spelbrink,J.N., Holt,I.J. and Jacobs,H.T. (2007) The mitochondrial transcription termination factor mTERF modulates replication pausing in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 6458–6474.
44. Reyes,A., Yasukawa,T., Cluett,T.J. and Holt,I.J. (2009) Analysis of mitochondrial DNA by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Methods Mol. Biol.*, **554**, 15–35.
45. Markham,N.R. and Zuker,M. (2005) DINAMelt web server for nucleic acid melting prediction. *Nucleic Acids Res.*, **33**, W577–W581.
46. Markham,N.R. and Zuker,M. (2008) UNAFold: software for nucleic acid folding and hybridization. *Methods Mol. Biol.*, **453**, 3–31.
47. Szymanski,M., Barciszewska,M.Z., Erdmann,V.A. and Barciszewski,J. (2002) 5S Ribosomal RNA Database. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 176–178.
48. Szymanski,M., Barciszewska,M.Z., Erdmann,V.A. and Barciszewski,J. (2003) 5 S rRNA: structure and interactions. *Biochem. J.*, **371**, 641–651.
49. Sugimoto,N., Nakano,S., Katoh,M., Matsumura,A., Nakamuta,H., Ohmichi,T., Yoneyama,M. and Sasaki,M. (1995) Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes. *Biochemistry*, **34**, 11211–11216.
50. Bornstein,B., Mas,J.A., Fernandez-Moreno,M.A., Campos,Y., Martin,M.A., del Hoyo,P., Rubio,J.C., Arenas,J. and Garesse,R. (2002) The A8296G mtDNA mutation associated with several mitochondrial diseases does not cause mitochondrial dysfunction in cybrid cell lines. *Hum. Mutat.*, **19**, 234–239.
51. DiMauro,S. and Schon,E.A. (2001) Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am. J. Med. Genet.*, **106**, 18–26.
52. Holt,I.J., Lorimer,H.E. and Jacobs,H.T. (2000) Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell*, **100**, 515–524.
53. Bowmaker,M., Yang,M.Y., Yasukawa,T., Reyes,A., Jacobs,H.T., Huberman,J.A. and Holt,I.J. (2003) Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J. Biol. Chem.*, **278**, 50961–50969.
54. Hyvarinen,A.K., Pohjoismaki,J.L., Holt,I.J. and Jacobs,H.T. (2011) Overexpression of MTERFD1 or MTERFD3 impairs the completion of mitochondrial DNA replication. *Mol. Biol. Rep.*, **38**, 1321–1328.
55. Yasukawa,T., Reyes,A., Cluett,T.J., Yang,M.Y., Bowmaker,M., Jacobs,H.T. and Holt,I.J. (2006) Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *EMBO J.*, **25**, 5358–5371.
56. Pohjoismaki,J.L., Holmes,J.B., Wood,S.R., Yang,M.Y., Yasukawa,T., Reyes,A., Bailey,L.J., Cluett,T.J., Goffart,S., Willcox,S. *et al.* (2010) Mammalian mitochondrial DNA Replication intermediates are essentially duplex but contain extensive tracts of RNA/DNA hybrid. *J. Mol. Biol.*, **397**, 1144–1155.
57. Wanrooij,S., Goffart,S., Pohjoismaki,J.L., Yasukawa,T. and Spelbrink,J.N. (2007) Expression of catalytic mutants of the mtDNA helicase twinkle and polymerase POLG causes distinct replication stalling phenotypes. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 3238–3251.
58. Brown,T.A., Cecconi,C., Tkachuk,A.N., Bustamante,C. and Clayton,D.A. (2005) Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes Dev.*, **19**, 2466–2476.
59. Smith,P.M. and Lightowers,R.N. (2011) Altering the balance between healthy and mutated mitochondrial DNA. *J. Inher. Metab. Dis.*, **34**, 309–313.
60. Smith,P.M., Ross,G.F., Taylor,R.W., Turnbull,D.M. and Lightowers,R.N. (2004) Strategies for treating disorders of the mitochondrial genome. *Biochim. Biophys. Acta*, **1659**, 232–239.
61. Holt,I.J. (2009) Mitochondrial DNA replication and repair: all a flap. *Trends Biochem. Sci.*, **34**, 358–365.
62. Clayton,D.A. (2003) Mitochondrial DNA replication: what we know. *IUBMB Life*, **55**, 213–217.
63. Pohjoismaki,J.L. and Goffart,S. (2011) Of circles, forks and humanity: topological organisation and replication of mammalian mitochondrial DNA. *Bioessays*, **33**, 290–299.
64. Clayton,D.A. (1982) Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell*, **28**, 693–705.
65. Moraes,C.T., Kenyon,L. and Hao,H. (1999) Mechanisms of human mitochondrial DNA maintenance: the determining role of primary sequence and length over function. *Mol. Biol. Cell*, **10**, 3345–3356.
66. Diaz,F., Bayona-Bafaluy,M.P., Rana,M., Mora,M., Hao,H. and Moraes,C.T. (2002) Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 4626–4633.
67. Bornstein,B., Mas,J.A., Patrono,C., Fernandez-Moreno,M.A., Gonzalez-Vioque,E., Campos,Y., Carrozzo,R., Martin,M.A., del Hoyo,P., Santorelli,F.M. *et al.* (2005) Comparative analysis of the pathogenic mechanisms associated with the G8363A and A8296G mutations in the mitochondrial tRNA(Lys) gene. *Biochem. J.*, **387**, 773–778.

Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome

Caroline Comte^{1&}, Yann Tonin^{1&}, Anne-Marie Heckel-Mager¹, Abdeldjalil Boucheham¹, Alexandre Smirnov^{1§}, Karine Auré^{2#}, Anne Lombès², Robert P. Martin¹, Nina Entelis^{1*}, Ivan Tarassov^{1*}

¹ Department of Molecular and Cellular Genetics, UMR Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie (GMGM), CNRS - Université de Strasbourg, Strasbourg, France;

² Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moëlle (CRICM); INSERM UMRS 975, CNRS UMR 7225, UPMC, Paris, France.

* corresponding authors : UMR7156 CNRS-Université de Strasbourg, 21 rue René Descartes
67084, Strasbourg, France
Tel. (+33) 3 90 24 14 60
Fax (+33) 3 88 41 70 70
E-mails: i.tarassov@unistra.fr
n.entelis@unistra.fr

& these authors contributed equally to this work.

current address: AP/HP Hôpital Ambroise Paré, Boulogne-Billancourt, France

§ current address: Institut für Molekulare Infektionsbiologie, Josef Schneider-Str. 2 /
D1597080 Würzburg, Germany

Content: Table S1

Figures S1 - S9

Table S1. Oligonucleotides used in the study.

Name	Sequence, 5'>3'	Purpose
FDper	AAGAGCCCTGTAGGG	FD-RNAs detection
T7pr	GGGATCCATAATACGACTCACTATA	T7 promotor
1095 F	TAGCCCTAAACCTCAACAGT	qPCR for 12S rRNA gene quantification
1305B	TGCGCTTACTTTGTAGCCTTCAT	qPCR for 12S rRNA gene quantification
11614F	CATTGCATACTCTTCAATCAGC	qPCR for KSS deletion quantification
11778B	CGACTGTGAGTGCGTT	qPCR for KSS deletion quantification
Control RNA	GAGAACTAAGCACTG	Control RNA detection by Northern hybridization
FD	GAGTCATACGCGCTACCGATTGCGCCAACAAGGC	FD-RNAs detection by Northern hybridization, homology to the D-arm of tRK1
15251-15680F	CTTAAAGCTTCACACGATTCTTTACCTTTC	Cloning of the WT mtDNA fragment 15251-15680, forward
15251-15680R	TCTTTGGAATTCGTTTGGATATATGGAGGATGG	Cloning of the WT mtDNA fragment 15251-15680, reverse
8099-8365/15438-15680F	TACTACAAGCTTACAGATGCAATCCCCGGACG	Cloning of the KSS mtDNA fragment 8099-8365/15438-15680, forward
8099-8365/15438-15680R	TCTTTGGAATTCGTTTGGATATATGGAGGATGG	Cloning of the KSS mtDNA fragment 8099-8365/15438-15680, reverse
5.8S Hm F/T7	TAGATCTAATACGACTCACTATAGACTCTTAGCGGTGG	RT-PCR of 5.8S rRNA
5.8S Hm R	GGCCGCAAGTGCGTTCGAAG	Northern hybridization and RT-PCR of 5.8S rRNA
KSSrtF	CCTGAATACAGTGCTTAC	RT-PCR 5S-KSS-L
KSSrtR	CCTGAAAAGTAAGCACTG	RT-PCR 5S-KSS-H
KSS-F-bio	biotin-TCAGTAGACAGTCCCACCCTC	purification of ssDNA-KSS, forward
WT-F-bio	biotin-ACAGATGCAATCCCCGGACG	purification of ssDNA-WT, reverse
R-bio	biotin-GTTTGGATATATGGAGGATGG	purification of ssDNA-KSS, reverse
HmLmit	GAACCTCTGACTGTAAAG	mt-tRNA-Leu detection by Northern hybridization
Actin-F	TCACCCACACTGTGCCCATCTACGA	qPCR quantification of nuclear DNA
Actin-R	CAGCGGAACCGCTCATTGCCAATGG	qPCR quantification of nuclear DNA

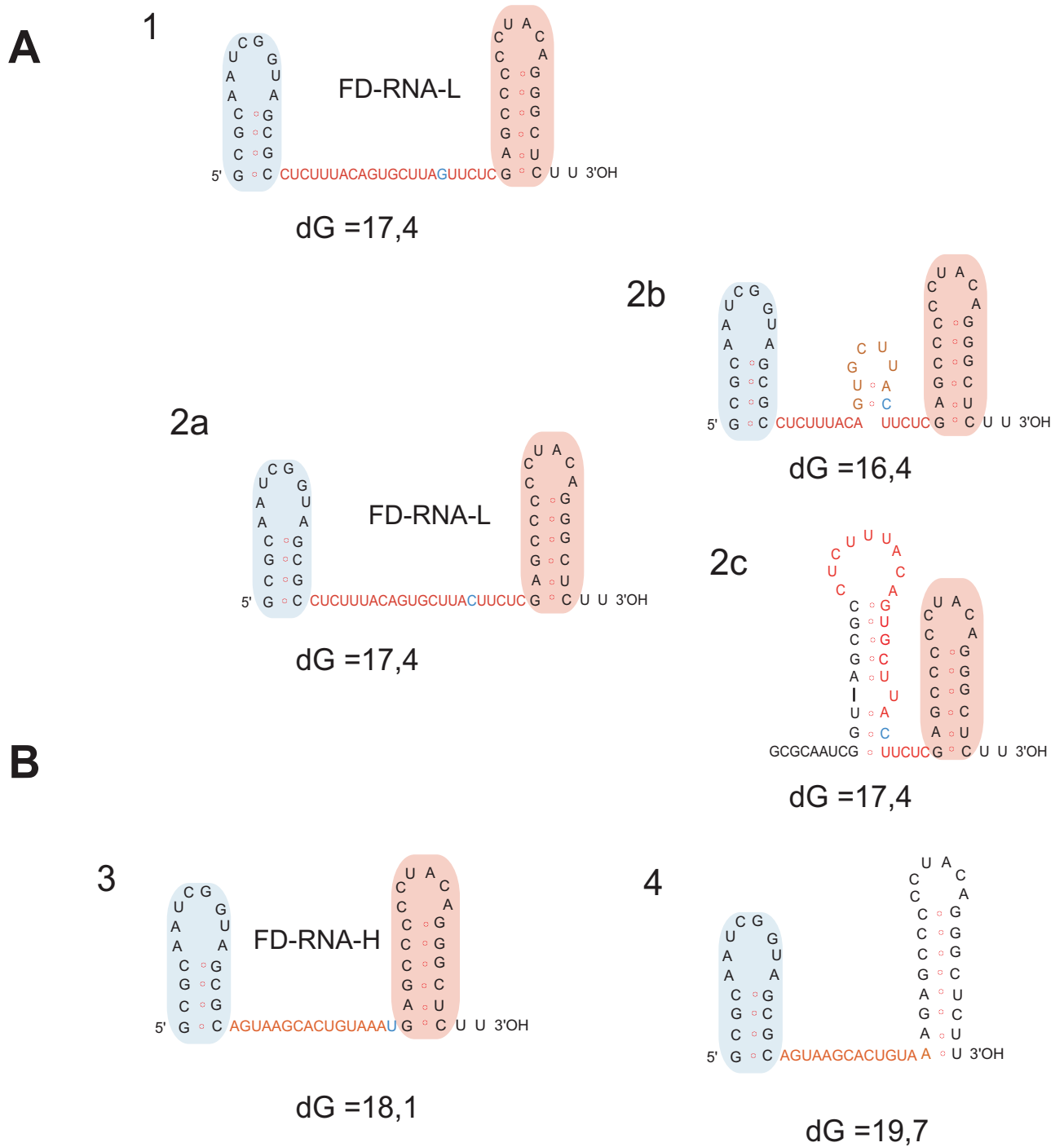


Figure S1. Design of FD RNA-based mitochondrial vectors. The free energy (dG) of each RNA is indicated below in kcal/mol. **(A)** Secondary structure of FD-RNA-L predicted by Mfold. The structure n°1 corresponds to the FD RNA L in which the 17th C of insertion is replaced by G (in blue), leading to only one structure. The predicted alternative structures 2a,b,c correspond to the FD RNA L without this mismatch. **(B)** Secondary structure of FD-RNA-H predicted by Mfold. The structure n°3 corresponds to the molecule in which an U has been introduced between the 3' part of the insert and the F helix (shown in blue). n°4 corresponds to the secondary structure of FD RNA H without additional U.

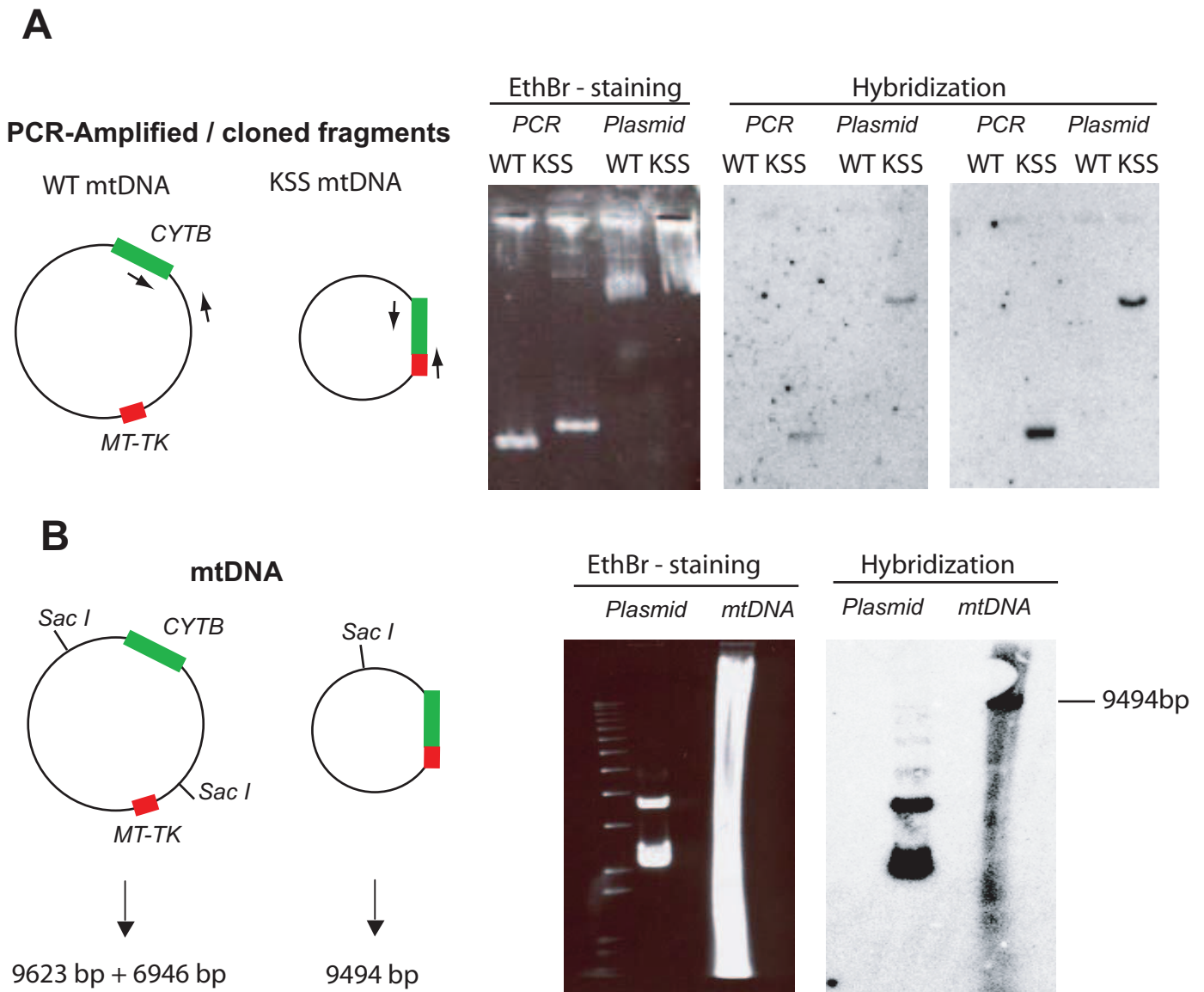


Figure S2. Analysis of the specificity of FD-L and FD-H RNAs interaction with mutant mtDNA by Southern hybridisation. **(A)** Hybridization of ³²P-labeled RNAs with PCR-amplified fragment containing either the KSS deletion borders or a nearby localized WT mtDNA sequence (localization of the primers is indicated by the arrows in the left picture). **(B)** Hybridisation of labeled FD-L RNA with *Sac*I-cleaved mtDNA and (as control) with the plasmid containing KSS deletion boundary region. At the left, restriction maps of WT and KSS mtDNA. MT-TK, the tRNA(Lys) gene.

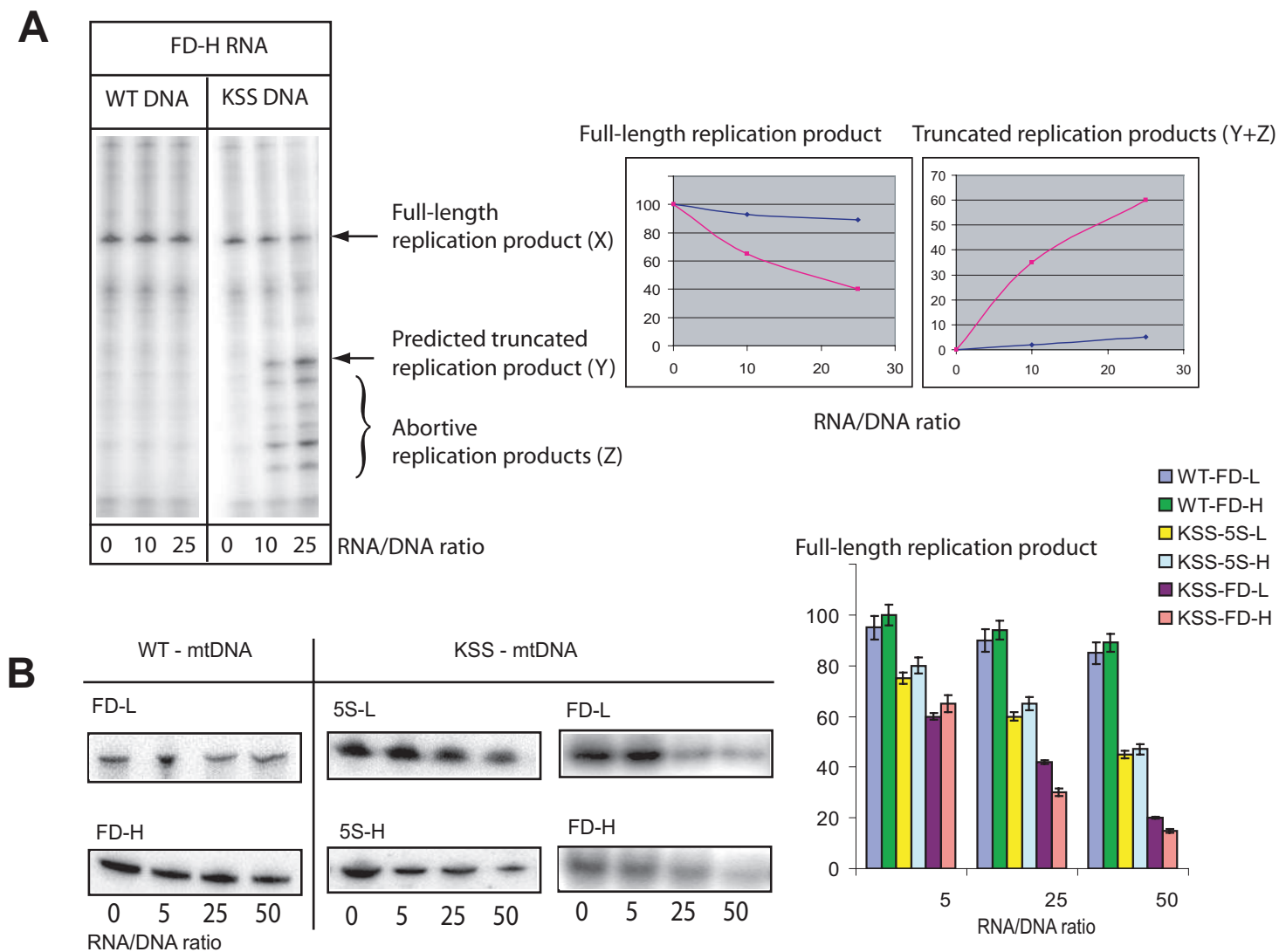
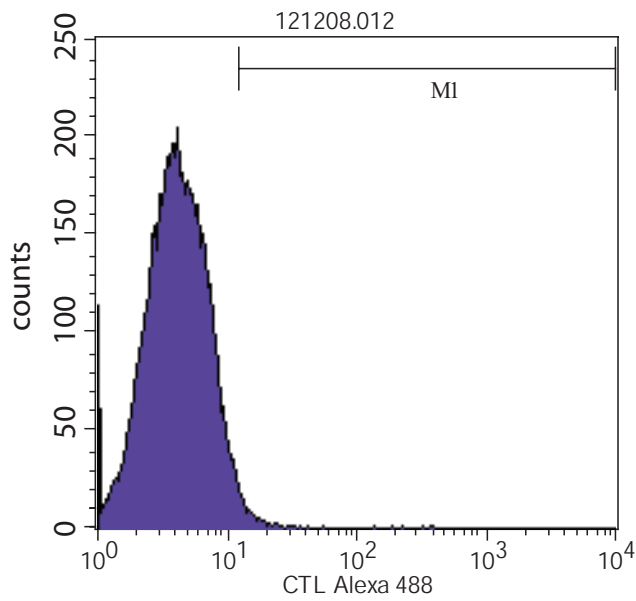
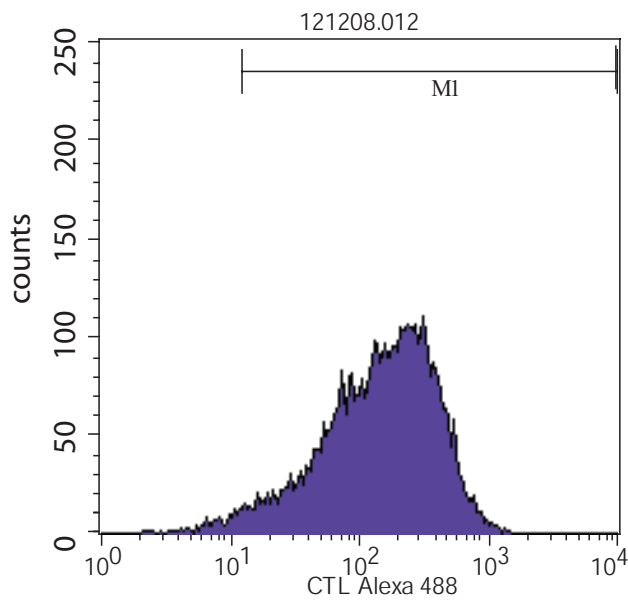


Figure S3. The effect of recombinant RNA on mtDNA replication in vitro. Replication run-off assay comprised PCR-amplified mtDNA fragments containing wild-type mtDNA or KSS-mtDNA sequences, $[^{32}\text{P}]$ -5'-labeled specific primers and a mitochondrial protein fraction containing replication enzymes obtained from beef liver mitochondria. (A) Autoradiography of denaturing PAGE demonstrating in vitro replication of KSS or wild type mtDNA fragments in the presence of increasing amounts of FD-H recombinant RNA. RNA/DNA molar ratio is shown below the panel. Several bands of intermediate abortive replication products (Z) can appear due to degradation of the main truncated product of predicted size (Y). The graphs at the right represent the relative amounts of mtDNA replication products upon increasing amounts of FD-H RNA, 100%, replication in absence of RNA. (B) The anti-replication effect of various recombinant RNAs. Only the full-size replication product is shown and quantified here. The autoradiograph represent one of the experiments, the diagrams at the right result from 4 independent experiments.



Sample ID: TSFR CTL Gate: G1
Gated Events: 25727

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean
All	25727	100.00	86.49	4.67	4.06
M1	278	1.08	0.93	20.90	16.08



Sample ID: TSFR Optimum Fluo Gate: G1
Gated Events: 22539

Marker	Events	% Gated	% Total	Mean	Geo Mean
All	22539	100.00	83.06	196.43	136.17
M1	22135	98.21	81.57	199.85	143.26

Figure S4. Verification of the efficiency of cybrid cells transient transfection with FD-L RNA by FACS. X-axis indicates the number of collected cells, Y-axis - the intensity of fluorescence. The upper panel corresponds to cells transfected with non-fluorescent RNA, while the bottom one - to cells transfected with FD-L RNA labeled by Alexa 488. The percentage of fluorescent cells present in the selected window M1 is outlined by a red square.

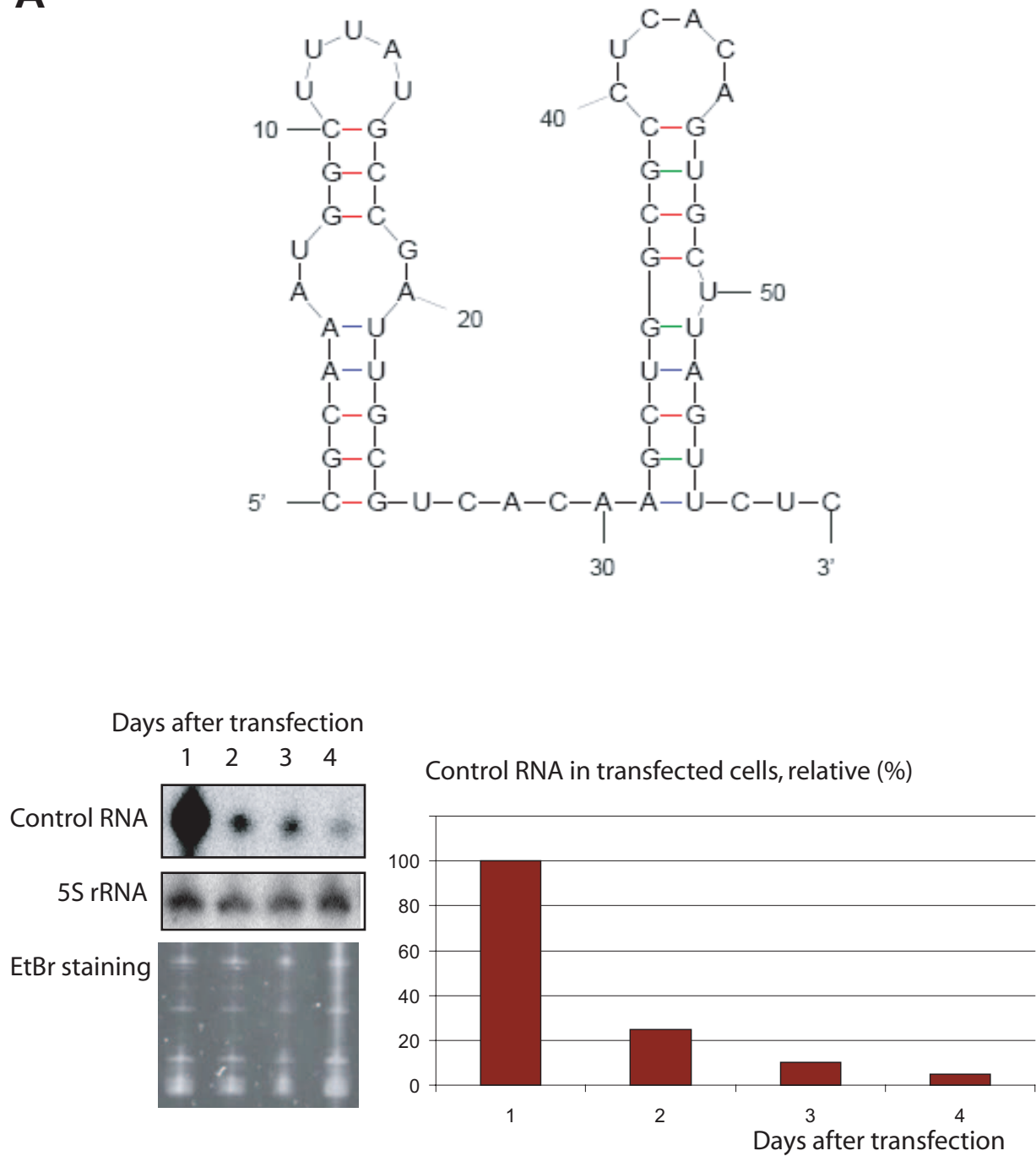
A

Figure S5A. Analysis of the stability of the control non-imported RNA in transfected KSS cybrid cells. Upper panel: predicted secondary structure of the control RNA. Bottom panel: Northern hybridisation of total RNA extracted from transiently transfected cells with ^{32}P -labeled RNA-specific probe (Control RNA) and 5S rRNA probe (as a quantitative control). At the lower panel, Ethidium Bromide staining of the same gel is shown. The graph at the right represents the time-dependence of RNA decay (as in Fig. 3A, see Methods for details). Detected amount of RNA at day 1 compared to day 2 after transfection is very important, probably due to attachment of RNA-containing Lipofectamin granules on the cell surface, thus, this value can be over-estimated. The rate of Control RNA degradation in cybrid cells in 2, 3 and 4 days after transfection is comparable to those of imported FD-RNAs (Fig. 3A), so the absence of Control RNA in the mitochondria in 2 days after transfection (Fig. 3B) proves the selectivity of RNA import process.

B

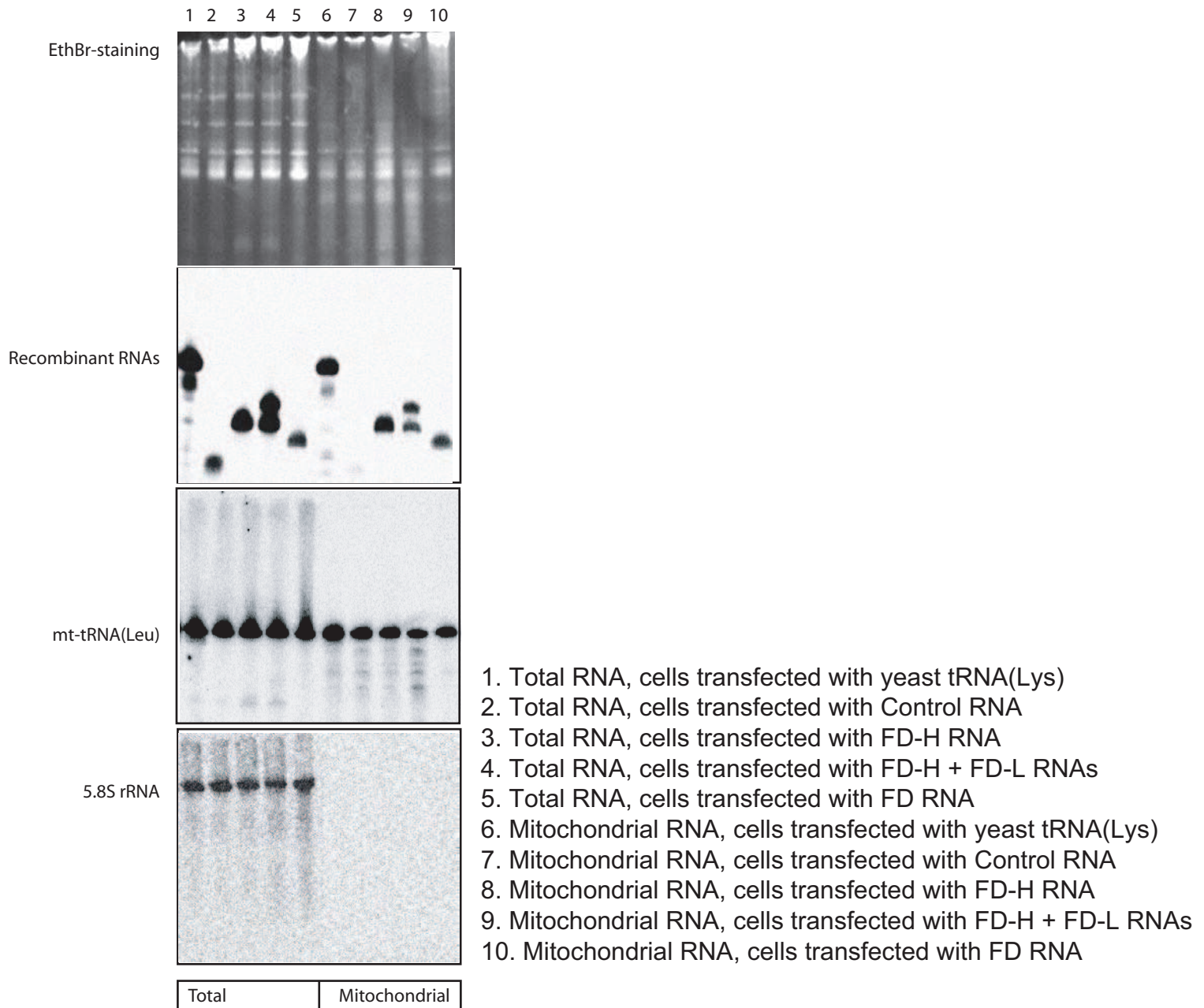


Figure S5B. Mitochondrial import of recombinant FD-RNAs in transiently transfected cybrid cells. An example of urea-PAGE separation (upper panel) and hybridisation analysis of RNA isolated from cells (lanes 1-5) and purified mitochondria (lanes 6-10), as indicated below, 2 days after transfection with RNA indicated at the right. Hybridisation probes are indicated at the left. The signals in the mitochondrial fraction are weaker with the probe to mt-tRNA as compared to the total sample, indicating on the partial loss of mtRNA during the mitochondria isolation and purification. Total RNA samples were isolated from the twice less amount of cultured human cells comparing to starting material for mitochondria purification (25 cm² of cells).

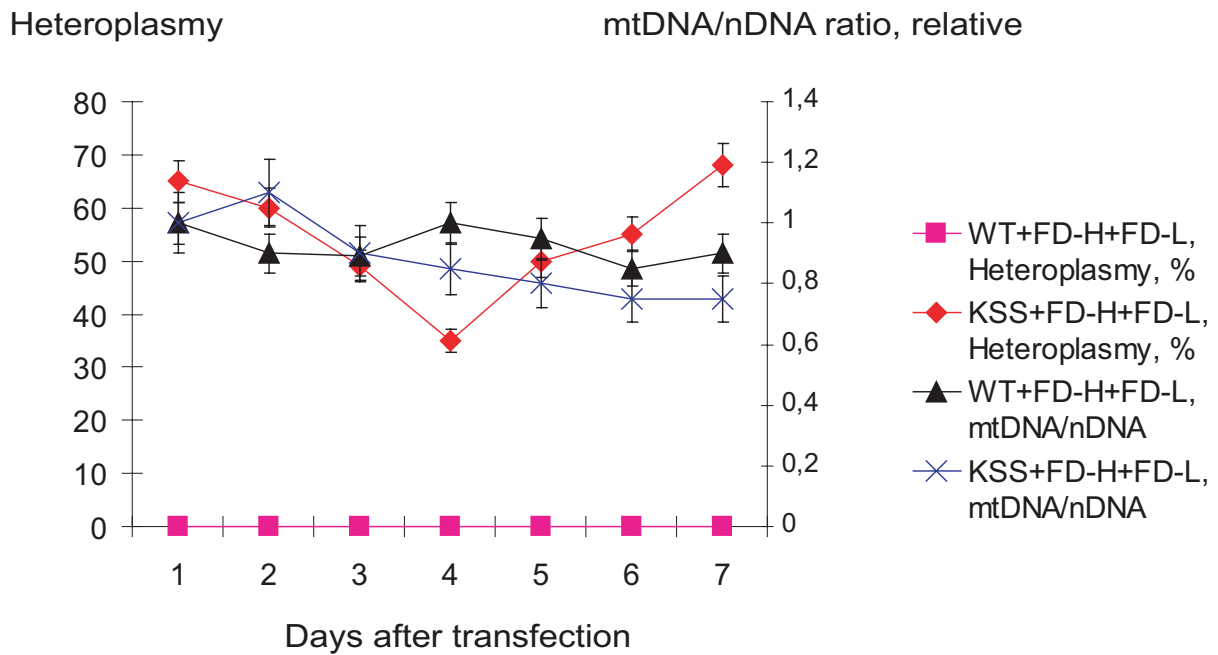
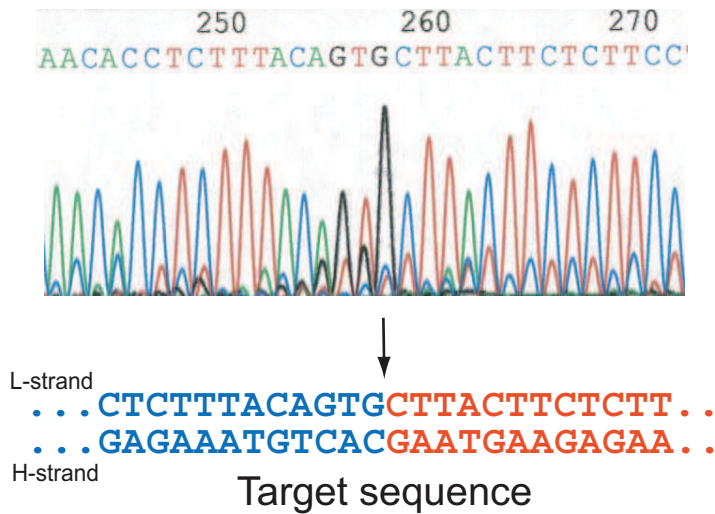
A**B**

Figure S6 A. Results of real-time qPCR analysis of heteroplasmy levels (at the left) and of the ratio between mitochondrial and nuclear DNA (at the right) in wild type (WT) and KSS cybrid cells (KSS) transfected with two recombinant anti-replicative RNAs, FD-H and FD-L. **B.** Analysis of the stability of the KSS deletion joint point in transfected cybrid cells. An example of the PCR-amplified mtDNA sequence is presented, which demonstrate the absence of heterogeneity of the initial deletion boundaries. Such verifications were systematically performed at different time points after transient transfection, as well as in stably transfected clones.

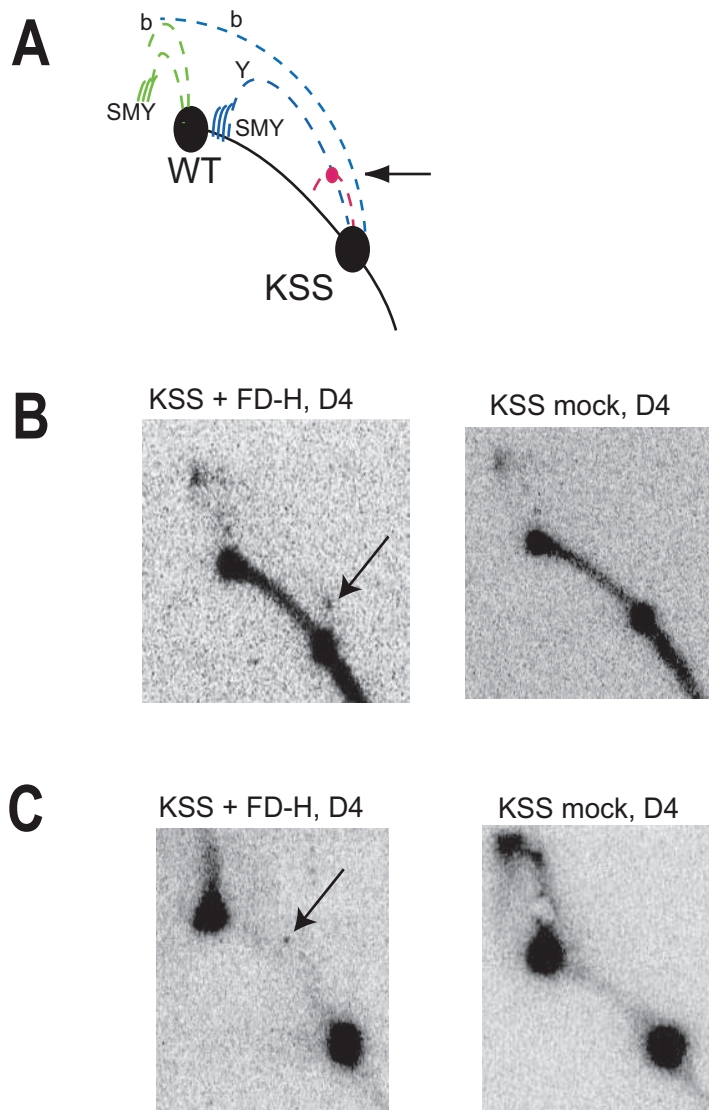


Figure S7. Recombinant RNA affects mutant mtDNA replication in vivo. (A) Schematic representation of replication intermediates (RI): in green, RI corresponding to wild type mtDNA; in blue, corresponding to mutant mtDNA. b, bubble arcs; Y, y arc; SMY, slow migrating y arcs. (B,C) Native 2D agarose gel electrophoretic analysis of mtDNA isolated from KSS cybrid cells. MtDNA was digested with BlnI, blotted and hybridised with P32 labelled fragment of the Cyt b gene (as in Fig.4). Results of two independent experiments are presented, left panels - mtDNA isolated from cells in 4 days after transfection with anti-replicative RNA FD-H; right panels - mtDNA from mock-transfected cells (treated with Lipofectamin but without any RNA), isolated and separated in the same conditions as one presented at the left. The site of replication pausing, visible only in cells transfected with FD-H RNA, is shown by arrow.

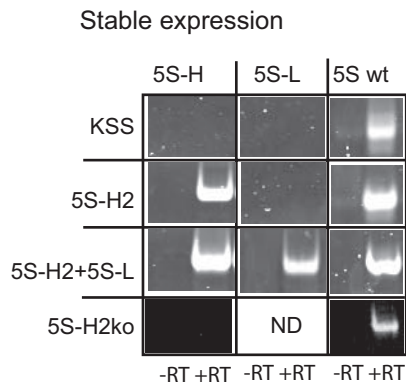
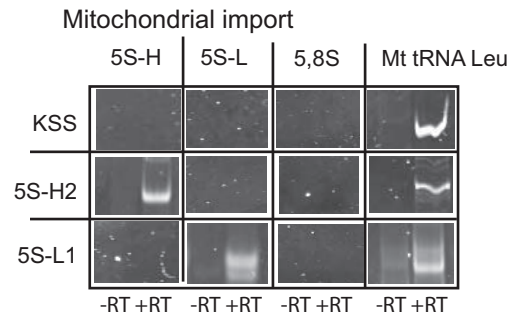
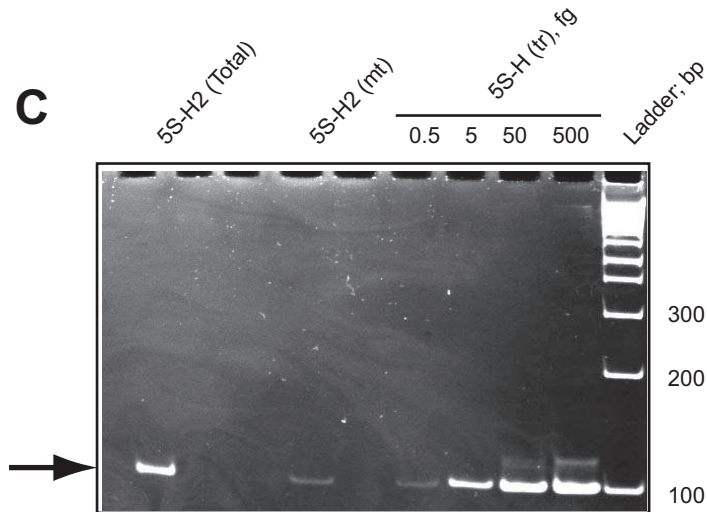
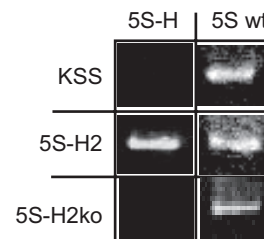
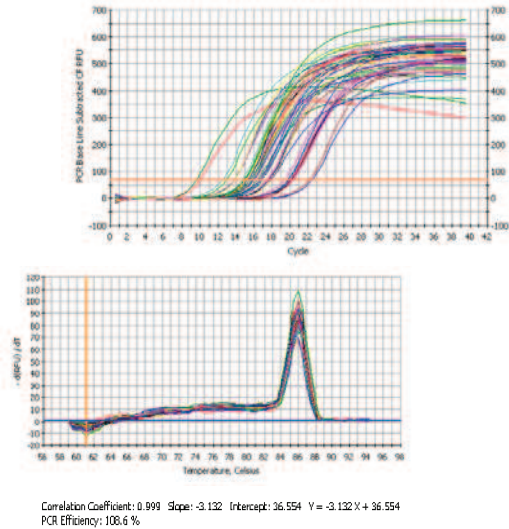
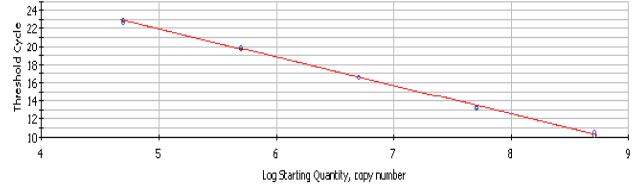
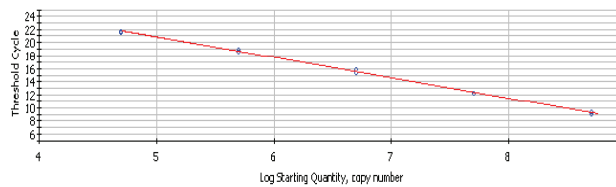
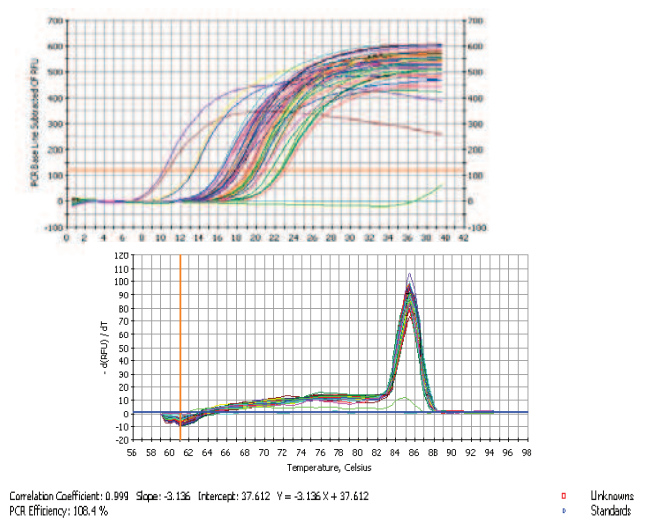
A**B****C****D**

Figure S8. Expression and import of recombinant RNAs in stable clones. (A) RT-PCR analysis of expression of 5S-H or both recombinant 5S RNAs in stable cell lines. (B) Mitochondrial import of recombinant 5S rRNAs detected by RT-PCR. Amplified RNAs are indicated above the panel, cell lines are shown at the left: KSS, mock-transfected cells; 5S-H2, clone expressing 5S-H RNA; 5S-L1, clone expressing 5S-L RNA; 5S-H2ko, subclone of 5S-H2 which has lost 5S-H RNA expression. -RT, control without reverse transcriptase. ND, non-determined. (C) Semi-quantitative RT-PCR of 5S-H in the stable clone 5S-H2. RNA samples corresponding to known amount of cells (Total) or mitochondria (mt) were analysed, in parallel with fixed amounts of the corresponding T7-transcript. Full-size PCR product is indicated by the arrow. (D) PCR analyses of the presence of the transgene in the 5S-H2ko cell line.

12S, for total mtDNA copies



ZDC, for wild-type mtDNA copies



Identifier	SQ Mean	SQ Std. Dev.	Ct Mean	Ct Std. Dev.	SQ zdc/12s	correction	KSS deletion
12S for total mtDNA							
WT	1,32E+07	1,24E+06	15,02	1,36E-01	5,67E-01	1,00E+00	0%
Mt	2,52E+06	9,96E+04	17,39	5,67E-02	2,05E-01	3,61E-01	64%
clone 5S-H5	5,88E+06	5,50E+05	16,18	1,37E-01	2,96E-01	5,22E-01	48%
clone 5S-H8	1,23E+07	1,14E+06	15,12	1,34E-01	3,14E-01	5,54E-01	45%
clone 5S-H7	9,44E+06	4,87E+05	15,5	7,40E-02	3,26E-01	5,76E-01	42%
clone 5S-H2	1,82E+07	2,29E+06	14,56	1,82E-01	3,76E-01	6,64E-01	34%
ZDC for wt mtDNA							
WT	7,49E+06	3,58E+05	15,25	6,89E-02			
Mt	5,16E+05	5,05E+04	19,15	1,43E-01			
clone 5S-H5	1,74E+06	1,07E+05	17,37	8,85E-02			
clone 5S-H8	3,86E+06	2,04E+05	16,21	7,71E-02			
clone 5S-H7	3,08E+06	3,03E+04	16,54	1,43E-02			
clone 5S-H2	6,85E+06	4,10E+05	15,38	8,57E-02			

Figure S9. An example of the real-time qPCR experiment. 12S and ZDC, two pairs of primers, amplifying the 210 bp fragment of 12S rRNA gene region as a value showing all mtDNA molecules, and the 164 bp fragment of the deleted region (ZDC for Common Deletion Zone) as a value showing only wild type mtDNA molecules. On the middle panels, the melting curves following 40 cycles of amplification are presented. Lower panels represent the standard calibration curves, obtained with 5 serial dilutions of linearized plasmid DNA (10^4 - 10^7 copies per sample). The same DNA was used to set up standard curve reactions in every plate in the study. Below the panels, experimental data and heteroplasmy calculation for DNA isolated from clones expressed 5S-H RNA. WT and Mt, DNA isolated from wild-type and cybrid KSS cells. Ct, Threshold cycle; SQ, Starting Quantity. Mean values and standard deviations (Std. Dev.) were estimated from analysis of each sample in triplicate.

II. Optimisation de la stratégie anti-génomique

Avec nos ARN recombinants, nous avons pu prouver qu'il était possible d'exploiter la voie d'import des ARN dans les mitochondries, pour y introduire des ARN recombinants induisant une diminution de l'hétéroplasmie *in vivo*. Mais comme nous l'avons vu, l'une des faiblesses de cette méthode est le caractère transitoire de la diminution qui a été induite. Malgré une baisse conséquente de plus de 30% du taux d'hétéroplasmie, on note un retour progressif de ce taux à son niveau initial 7 à 8 jours après la transfection, et ce dans le cas d'une transfection avec un seul ARN ou de 2 ARN combinés. Cet effet est probablement dû à la dégradation des ARN recombinants, entraînant une diminution progressive de leur concentration au sein de la cellule. Dans l'optique de contrecarrer cet effet, nous nous sommes penchés sur la modélisation d'ARN possédant des modifications chimiques censées accroître leur stabilité au sein de la cellule. C'est sur l'analyse de ces différentes molécules que porte ce chapitre qui se clôt par l'**Article n°3**, qui résume l'ensemble des données obtenues sur ce panel de molécules modifiées et présente le second volet de mon travail de recherche.

En introduction à cette partie, je souhaite également éclairer le lecteur quant à la nomenclature des ARN qui seront décrits à partir de maintenant. Dans un souci de clarté, j'ai décidé de nommer les ARN de la manière suivante :

- Les 2 premières lettres (**F/D/FD**) correspondent à la (ou aux) boucle(s) d'import dont l'ARN dispose. (ex. : **D22L**^{KSS}-Me signifie boucle D)
- Le chiffre qui suit se rapporte au nombre nucléotides de l'insert anti-répliatif. (ex. : **D22L**^{KSS}-Me pour 22 nucléotides)
- La dernière lettre (**H ou L**) correspond au brin d'ADNmt de même séquence que l'insert (ex. : **D22L**^{KSS}-Me signifie que l'insert est basé sur le brin L s'hybride au brin H)
- La mutation ciblée par l'ARN est pour sa part indiquée en exposant (ex. : **D22L**^{KSS}-Me dans le cas de la délétion KSS).
- Enfin, la présence de modifications chimiques est indiquée par – suivi du type de modification apportée (ex. : **D22L**^{KSS}-**Me** pour un groupe méthyle)

Pour la suite, j'invite donc le lecteur à se référer à cette nomenclature qui est rappelée sur le marque-page fourni.

1. Création des ARN anti-génomiques modifiés

Pour tenter d'augmenter la demi-vie de nos ARN, des modifications chimiques peuvent être apportées à leur structure mais avec toutefois quelques limites. En effet, pour que ces modifications soient profitables, il ne faut pas altérer les propriétés premières des ARN recombinants, à savoir leur capacité à être importés dans les mitochondries. Pour cela, aucune modification ne sera apportée au niveau des boucles F et D, des changements même mineurs risquant de déstabiliser les structures en tige-boucle, ou bien d'empêcher la reconnaissance des ARN par les facteurs protéiques et donc par conséquent d'annihiler l'import au sein des mitochondries. De plus, si une région de l'ARN possède une fragilité plus grande ce serait plutôt l'insert anti-répliatif, qui étant simple brin est plus sensible à une dégradation via l'action des RNases. C'est donc ce site, qui plus exposé, doit être protégé en priorité. Pour cela, nous disposons d'un arsenal varié de modifications chimiques (**Figure 37**) dont la création est le fruit d'une collaboration étroite avec le laboratoire du Dr Alya Venyaminova (Institut de Biologie Chimique et de Médecine Fondamentale de Novossibirsk, Russie).

La première d'entre elles consiste en l'ajout de groupements méthyles ou fluors. Fixés au niveau du groupement OH en position 2' du ribose, ce type de modifications vise à assurer une protection accrue contre les endonucléases, et peuvent être ajoutées sur l'ensemble du squelette de l'insert ou bien seulement au niveau des positions les plus sujettes à la dégradation. Autre option, il est possible d'ajouter au niveau de l'extrémité 3'OH une base inversée, dans le cas présent une thymidine, qui a pour but de protéger l'extrémité 3' des ARN de l'action des exonucléases par la création d'une liaison 3'-3' phosphodiester. Enfin, dernier type de modification envisagée, la création de molécules que l'on pourrait qualifier d'hybrides ou chimériques, l'insert anti-répliatif étant remplacé par son équivalent ADN. Ce type de modification permet d'assurer une meilleure protection contre les RNases.

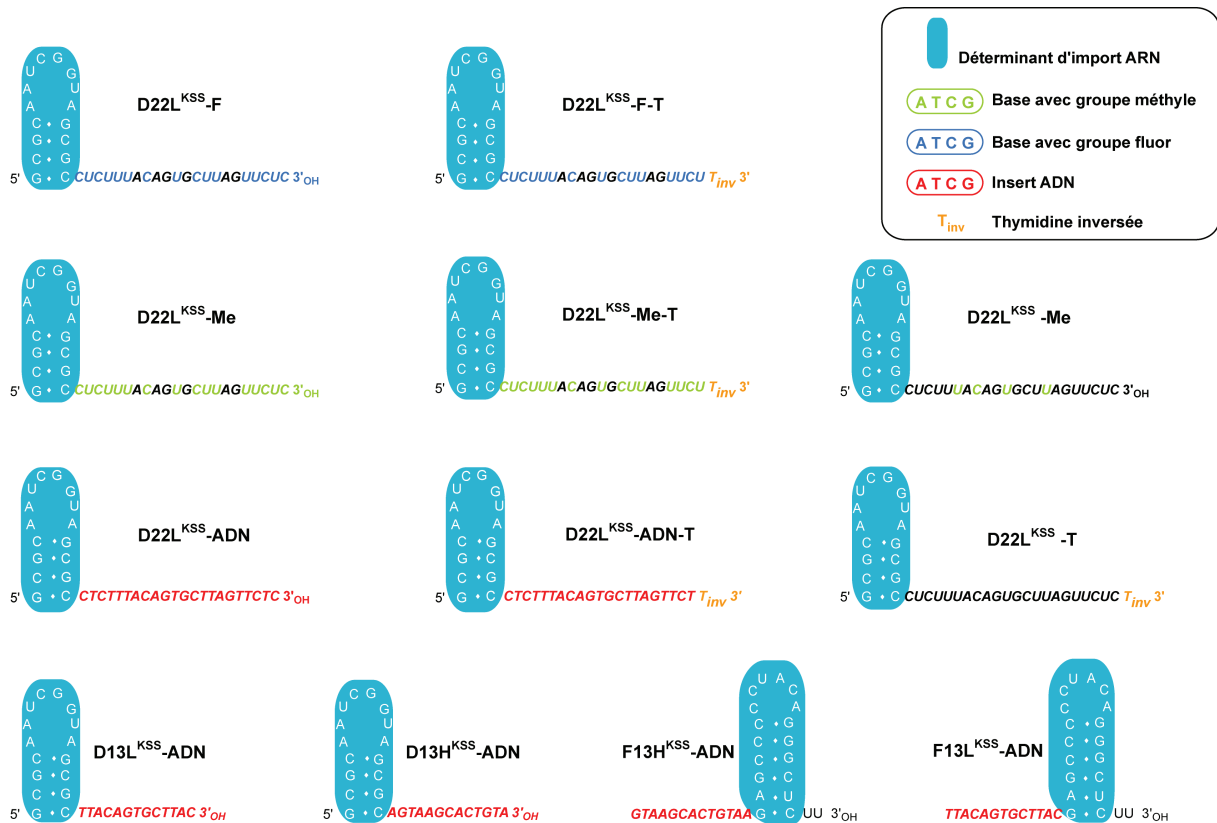


Figure 37 : Structures des ARN recombinants modifiés

Structures des ARN modifiés. Différents groupements chimiques peuvent être ajoutés tels des groupes méthyles (en vert), fluorés (en bleu) ou thymidines inversées (en orange). L'insert ARN habituel peut même être remplacé par une version ADN (en rouge).

Pour fournir le squelette qui porterait ces différentes modifications, notre première idée fut d'utiliser les ARN FD-H et FD-L, mais leur longueur en rendant la synthèse difficile, nous avons alors dû reporter notre choix sur un ARN plus court. C'est ainsi que nous avons opté pour l'ARN D22L^{KSS}. Capable d'induire une baisse d'hétéroplasmie, même si quelque peu plus faible que celle engendrée par FD-H ou FD-L, cet ARN ne possède qu'une seule boucle d'import ce qui le rend plus facile à synthétiser. Précisons au passage, que l'absence de cette seconde boucle d'import n'affecte en rien l'import de D22L^{KSS}, mais le rend potentiellement plus fragile qu'un ARN anti-génomique classique.

C'est sur la base de cette structure que les premières versions d'ARN modifiés ont été synthétisées avant d'être testées à l'époque par le Dr Caroline Comte. Malheureusement, aucun de ces ARN n'a été capable d'induire une quelconque diminution du taux d'hétéroplasmie. Pour expliquer les raisons de ce revers, plusieurs hypothèses ont été avancées. Il a ainsi été proposé que les inserts des versions modifiées présentaient une température d'hybridation trop élevée, qui ne permettait pas de stabiliser l'effet induit sur

l'hétéroplasmie, et pouvait même conduire à une inhibition de la réplication de l'ADNmt sauvage. Autre supposition, les modifications apportées au niveau de l'insert rigidifieraient sa structure, rendant alors difficile son accès à l'ADNmt.

Dans l'idée de vérifier ces hypothèses, l'équipe du Dr Venyaminova nous a alors synthétisé un nouveau jeu d'ARN possédant un insert plus court (13 nucléotides), censé en diminuer la température d'hybridation. Pour voir si notre idée était la bonne, j'ai donc testé la spécificité et l'effet sur l'hétéroplasmie ces nouveaux ARN.

2. Evaluation de la spécificité des ARN modifiés

Le premier élément à tester suite à l'introduction de modifications est la spécificité d'hybridation des ARN, pour ainsi vérifier que l'insert même modifié conserve sa capacité à s'hybrider de manière spécifique à l'ADNmt mutant. Pour cela, nous avons recours à une hybridation de type Southern dans des conditions proches des conditions physiologiques. Les ARN marqués sont mis en présence d'un fragment d'ADNmt sauvage ou muté contenant délétion KSS, et leur spécificité est évaluée en établissant le ratio entre l'intensité du signal d'hybridation pour le fragment sauvage et muté (KSS) (**Figure 38**).

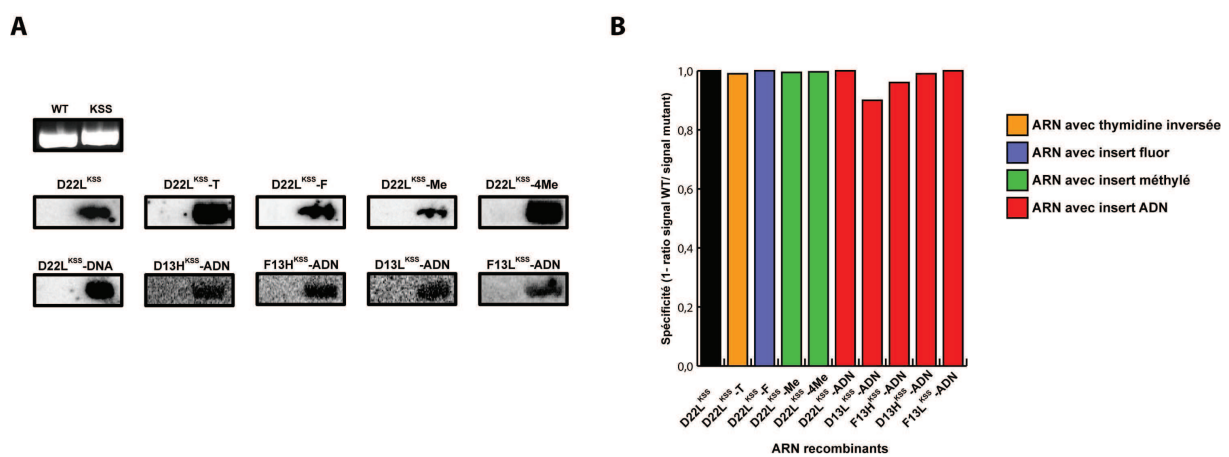


Figure 38 : Spécificité d'hybridation des ARN recombinants modifiés

(A) Hybridation de type Southern des ARN modifiés. La spécificité des différents ARN vis-à-vis de l'ADN mutant (KSS) ou sauvage (WT) a été testée. (B) Représentation graphique de la spécificité d'hybridation de chaque ARN. Une valeur de 1 indique une spécificité totale vis-à-vis de l'ADNmt mutant.

Les résultats obtenus via ce test montrent une très haute spécificité pour l'ensemble des ARN modifiés qui sont capables de discriminer et de s'hybrider de manière très spécifique à l'ADNmt mutant.

3. Evaluation de la stabilité des ARN modifiés *in vivo*

Les ARN ayant prouvés leur potentiel *in vitro* sont ensuite utilisés *in vivo*. Leur structure étant basée sur celle de nos ARN recombinants habituels et ces tests ayant déjà été réalisés par le passé, la capacité d'import des ARN n'est pas testée dans le cas présent. Pour cela, les cellules cybrides porteuses de la délétion sont transfectées avec les différents ARN. La stratégie utilisée pour déterminer leur stabilité au sein des cellules consiste à prélever un aliquote de cellules chaque jour après la transfection. Les échantillons de cellules sont alors traités pour en extraire le contenu en ARN total qui est déposé sur gel. Le premier jour suivant la transfection est utilisé comme jour référence et correspond à 100%.

Les résultats obtenus suite à cette étude montrent que l'ajout de ces différentes modifications participent à l'augmentation de la stabilité nos ARN. En effet, la demi-vie de nos ARN peut varier du simple au double en fonction du groupement qui lui est joint et de sa localisation au sein de l'insert. Par exemple, l'ajout d'un groupement fluor ne semble avoir aucune influence sur la stabilité de l'ARN, alors que l'addition d'une thymidine inversée au niveau de l'extrémité 3' de l'ARN permet de doubler la demi-vie de l'ARN, la faisant passer d'environ 18h à près de 36h. Cette durée peut encore être augmentée lorsque l'on associe cette thymidine à un insert ADN. Face à cela, certaines modifications ont une influence toute variable selon leur distribution au niveau de l'insert. C'est le cas des groupements méthyles qui lorsqu'ils sont disséminés le long de l'insert n'augmente la stabilité de l'ARN que de quelques heures, alors que disposés au niveau de positions identifiées comme des sites majeurs de clivage, ils permettent de tripler la demi-vie de l'ARN modifié. La raison de cette différence pourrait s'expliquer par une rigidité trop importante de la molécule lorsque celle-ci est recouverte dans son ensemble par les groupements méthyles. Cette contrainte structurale empêcherait alors le repliement de l'ARN sous une conformation favorable, et laisserait apparent l'insert qui serait plus accessible aux endonucléases.

4. Evaluation de l'effet sur l'hétéroplasmie des ARN modifiés

Alors que l'ajout de modifications chimiques semble avoir un impact positif sur la stabilité des ARN, les résultats observés quant à leur effet sur l'hétéroplasmie ne suivent pas la même tendance. Suite à une analyse par qPCR des échantillons collectés après la

transfection, nous avons démontré que hormis D22L^{KSS}, l'ARN nous ayant servi de modèle, seul D22L^{KSS}-ADN est capable d'induire une diminution transitoire mais reproductible du taux d'hétéroplasmie. Plus qu'une absence d'effet, l'ajout d'autres modifications semble avoir un effet inhibiteur sur la capacité des ARN à induire une diminution de l'hétéroplasmie. Cette perte de fonction de l'activité anti-répliquative des ARN recombinants est probablement due à l'incapacité des molécules modifiées à former un complexe stable avec l'ADNmt, qu'il soit muté ou sauvage. Alors que les premiers tests effectués *in vitro* montraient une spécificité accrue vis-à-vis des molécules mutées, ces derniers résultats prouvent une fois de plus que la mise au point de telles molécules ne peut se passer d'un test *in vivo*. Les figures associées à cette étude sont présentées dans l'**Article n°3**.

 Article n°3**Characterization of chemically modified oligonucleotides targeting a pathogenic mutation in human mitochondrial DNA**

Yann Tonin^{1&}, Anne-Marie Heckel-Mager^{1&}, Ilya Dovydenko^{1,2}, Mariya Meschaninova², Caroline Comte¹, Alya Venyaminova², Dmitrii Pyshnyi², Ivan Tarassov¹ and Nina Entelis^{1*}
(2013) *Biochimie* - S0300-9084(13)00292-7. 10.1016

¹Department of Molecular and Cellular Genetics, UMR Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie (GMGM), CNRS – Université de Strasbourg, Strasbourg, France

²Laboratory of RNA Chemistry, Insitute of Chemical Biology and Fundamental Medecine SB RAS, Novosibirsk 630090 Russia

& contribution égale à cette étude



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: www.elsevier.com/locate/biochi

Research paper

Characterization of chemically modified oligonucleotides targeting a pathogenic mutation in human mitochondrial DNA

Yann Tonin^{a,1}, Anne-Marie Heckel^{a,1}, Ilya Dovydenko^{a,b}, Mariya Meschaninova^b,
Caroline Comte^a, Alya Venyaminova^b, Dmitrii Pyshnyi^b, Ivan Tarassov^a, Nina Entelis^{a,*}

^a Department of Molecular and Cellular Genetics, UMR 7156 Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie (GMGM), Strasbourg University – CNRS, Strasbourg 67084, France

^b Laboratory of RNA Chemistry, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk, Russia

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 June 2013

Accepted 18 August 2013

Available online xxx

Keywords:

Mitochondria

RNA import

Modified oligonucleotides

mtDNA heteroplasmy

Cybrid cells

ABSTRACT

Defects in mitochondrial genome can cause a wide range of clinical disorders, mainly neuromuscular diseases. Most of the deleterious mitochondrial mutations are heteroplasmic, meaning that wild type and mutated forms of mtDNA coexist in the same cell. Therefore, a shift in the proportion between mutant and wild type molecules could restore mitochondrial functions. The anti-replicative strategy aims to induce such a shift in heteroplasmy by mitochondrial targeting specifically designed molecules in order to inhibit replication of mutant mtDNA. Recently, we developed mitochondrial RNA vectors that can be used to address anti-replicative oligoribonucleotides into human mitochondria and impact heteroplasmy level, however, the effect was mainly transient, probably due to a rapid degradation of RNA molecules. In the present study, we introduced various chemically modified oligonucleotides in anti-replicative RNAs. We show that the most important increase of anti-replicative molecules' lifetime can be achieved by using synthetic RNA–DNA chimerical molecules or by ribose 2'-O-methylation in nuclease-sensitive sites. The presence of inverted thymidine at 3' terminus and modifications of 2'-OH ribose group did not prevent the mitochondrial uptake of the recombinant molecules. All the modified oligonucleotides were able to anneal specifically with the mutant mtDNA fragment, but not with the wild-type one. Nevertheless, the modified oligonucleotides did not cause a significant effect on the heteroplasmy level in transfected *transmitochondrial* cybrid cells bearing a pathogenic mtDNA deletion, proving to be less efficient than non-modified RNA molecules.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

1. Introduction

RNA is increasingly used in clinical application [1]. RNA-based therapeutics includes inhibitors of mRNA translation, agents of RNA interference, ribozymes and aptamers binding various molecular targets. However, RNA is relatively unstable *in vivo* due to the plethora of ribonucleases in serum and in cells. Challenges with the delivery, specificity and stability of RNA therapeutics have spawned the development of chemically modified oligonucleotides [2]. Recently, we developed RNA vectors that can be used to address therapeutic oligoribonucleotides into human mitochondria [3].

Mitochondrial disorders represent a heterogeneous group of genetic diseases characterized by an oxidative phosphorylation deficiency, resulting from either nuclear or mitochondrial gene mutations [4,5]. Human mitochondrial genome (mtDNA) is a closed circular double-stranded molecule of 16,5 kb able to replicate autonomously and encoding only 13 polypeptides, 2 ribosomal RNA (12S and 16S) and 22 tRNA, the vast majority of mitochondrial proteins and several RNAs being encoded in the nucleus and imported *via* the cytosol. Various defects in the mitochondrial genome (deletions, duplications, point mutations) can cause a wide range of clinical disorders, mainly neuromuscular diseases. Up to now, no efficient therapeutic treatment has been developed against these pathologies. Since most of the deleterious mitochondrial mutations are heteroplasmic, meaning that wild type and mutated forms of mtDNA coexist in the same cell, the shift in proportion between mutant and wild type molecules is expected to restore mitochondrial functions [6].

We demonstrated that replication of mitochondrial DNA containing a pathogenic mutation can be specifically affected by RNA

Abbreviations: SO, synthetic oligonucleotides; KSS, Kearns Sayre Shy syndrome.
* Corresponding author. UMR 7156, Université de Strasbourg – CNRS, 21 Rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France. Tel.: +33 3 68 85 14 81; fax: +33 3 68 85 13 65.

E-mail address: n.entelis@unistra.fr (N. Entelis).

¹ YT and AMH equally contributed to this study.

molecules bearing oligonucleotide stretches complementary to the mutated region. These molecules can be targeted into human mitochondria using artificially engineered RNA based on the 5S rRNA or tRNA as vectors [3]. We have previously developed several successful models based on the mitochondrial import determinants of the yeast tRNA^{Lys}_{CUU} (further referred to as tRK1). Analysis of conformational rearrangements in this RNA demonstrated that protein factors binding and subsequent RNA import require formation of an alternative structure, different from a classic L-form tRNA model, characterized by bringing together the 3'-end and TΨC loop and forming the structure referred to as F-hairpin. Exploiting these data, we designed a set of short synthetic RNAs comprising two domains of tRK1 alternative structure, D-arm and F-hairpin, characterized by a high efficiency of mitochondrial targeting [7]. These molecules, fused to oligonucleotide stretches complementary to the mtDNA mutated region, were able to shift a heteroplasmy level in cells containing a large deletion in mtDNA. However, the effect was not permanent, disappearing in 7–8 days after transient transfection, probably due to a rapid degradation of RNA molecules [3].

In the present study, we attempted to increase the stability of the “anti-replicative” RNA molecules in human cells. For this purpose, we introduced into these molecules various chemically modified oligonucleotides and tested their impact on the efficiency of their hybridization with mtDNA *in vitro*, RNA stability, mitochondrial targeting and the effect on heteroplasmy in human cybrid cells in culture.

2. Materials and methods

2.1. Transmitochondrial cybrid cell line, transient transfection with RNA

Cultured skin fibroblasts derived from a patient diagnosed with a Kearns Sayre Shy syndrome were fused to a human rho0 osteosarcoma cell line (143B) as described [3]. Cybrid cells used in this study contained 65 ± 2% mutant mtDNA bearing a large deletion spanned from nucleotide 8363 to 15,438 thus removing 7075 base pairs including 9 structural genes and 6 tRNA genes.

Transient transfection with synthetic RNAs was performed as described in Refs. [8,9], with minor modification: for 2 cm² wells of 80%-confluent cells we used 0.25 μg of RNA. Transfections were performed with Lipofectamin-2000 in OptiMEM medium (Invitrogen), as described in the supplier's protocol. OptiMEM was changed to a standard DMEM medium the following day after the transfection. Transfection procedure did not lead to any detectable decrease of viability of the cells or to significant change of the overall mtDNA amount (measured by qPCR as described in Ref. [3]), suggesting the absence of synthetic RNAs toxicity.

2.2. Mitochondria isolation, assays for RNA stability and mitochondrial import

Mitochondria from cultured cybrid human cells were isolated as described in Ref. [10] by several rounds of high (20,000 g) and low (4000 g) centrifugations. After the second round of high-speed centrifugation of mitochondria, they were re-suspended in the breakage buffer (0.44 M mannitol, 20 mM Tris–HCl (pH 7.0), 20 mM NaCl, 1 mM EDTA) and centrifuged through two layers of sucrose (0.5 M and 1.5 M). Mitochondria were collected on the top of the 1.5 M layer and harvested by high-speed centrifugation. Mitochondria were treated with RNase A and digitonin to get rid of non-specifically attached RNA. Total and mitochondrial RNA were isolated with TRIzol reagent (Invitrogen).

Stability and mitochondrial import of synthetic RNA molecules were analysed by Northern hybridization of total and mitochondrial RNA with ³²P-labelled oligonucleotide probes against synthetic RNAs or against control cytosolic and mitochondrial RNA. The following probes were used: D-loop (5'-GAGTCA-TACGCGCTACCGATTGCGCCAACAAGGC-3'); 5.8S (5'-GGCCGCAAGT GCGTTCGAAG-3'); 5S (5'-CATCCAAGTACTACCAGGCC-3'); tRNA^{Thr} (5'-TCTCCGGTTTACAAGAC-3'); KSS part (5'-GCTAAGTAAGCACTGT A-3'). To compare the stability of different recombinant RNA, relative concentration (R_0, \dots, R_t) of each RNA in various time period (t) after transfection was calculated as a ratio between the specific probe signal and the signal for 5S rRNA probe. The half-life period of RNA was calculated as $t_{1/2} = \ln 2/k$, where the degradation constant k can be estimated according to the formula: $\ln R_t/R_0 = kt$.

Relative amounts of each imported RNA inside mitochondria were estimated after quantification in the Typhoon-Trio scanner as a ratio between the signal obtained after hybridization with a specific probe and the signal obtained after hybridization with a probe against the mitochondrial tRNA^{Thr} in the same RNA preparation, as described previously [8].

2.3. Mutant mtDNA heteroplasmy level analysis

Heteroplasmy level was measured by real-time PCR using SYBR Green (iCycler, MyiQ™ Real-Time Detection System, BioRad) as described previously [3]. Two pairs of primers were used: (1) amplifying the 210 bp fragment of 12S rRNA gene region (nucleotides 1095–1305 in mtDNA) not touched by the KSS deletion as a value showing all mtDNA molecules, and (2) amplifying the 164 bp fragment of the deleted region (nucleotides 11,614–11,778) as a value showing wild type mtDNA molecules. All reactions were performed in a 20 μl volume in triplicates. PCR using water instead of template was used as a negative control. PCR was performed by initial denaturation at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 60 °C, and 30 s at 72 °C. Specificity was verified by melting curve analysis and gel electrophoresis.

2.4. Chemical synthesis of modified oligonucleotides

All the oligonucleotides (Fig. 1) were synthesized on an automatic ASM-800 RNA/DNA synthesizer (Biosset, Novosibirsk, Russia) at 0.4 μmol scale using solid phase phosphoramidite synthesis protocols [11] optimized for this instrument. The DNA phosphoramidites, 2'-O-TBDMS-protected RNA phosphoramidites, 2'-OMe-pyrimidine RNA phosphoramidites, 2'-F-pyrimidine RNA phosphoramidites and appropriate supports were purchased from Glen Research (USA). Attachment of 3'-O-DMT-thymidine [12] to the CPG-500 solid carrier (Sigma–Aldrich) containing carboxylic groups was carried out as in Ref. [13]. A 5-ethylthio-*H*-tetrazole has been used as activator with 5, 10, 6 and 10 min coupling steps respectively for the phosphoramidites mentioned above. After standard deprotection, oligonucleotides were isolated *via* preparative electrophoresis in 12% polyacrylamide/8 M urea gel, followed by elution with 0.3 M NaOAc (pH 5.2)/0.1% SDS solution and precipitated with ethanol. Purified oligonucleotides were characterized by electrophoretic mobility in 12% denaturing polyacrylamide gel and by MALDI-TOF mass spectrometry (Autoflex III, Bruker Daltonics, Germany).

2.5. Synthetic RNA hybridization and thermal denaturation assays

To predict melting temperatures for DNA–DNA and RNA–DNA duplexes, we used IDT Sci-Tools OligoAnalyser 3.1 software [14]. Thermal denaturation experiments were performed on a Cary 300 BioMelt Spectrophotometer equipped with Temperature Probes

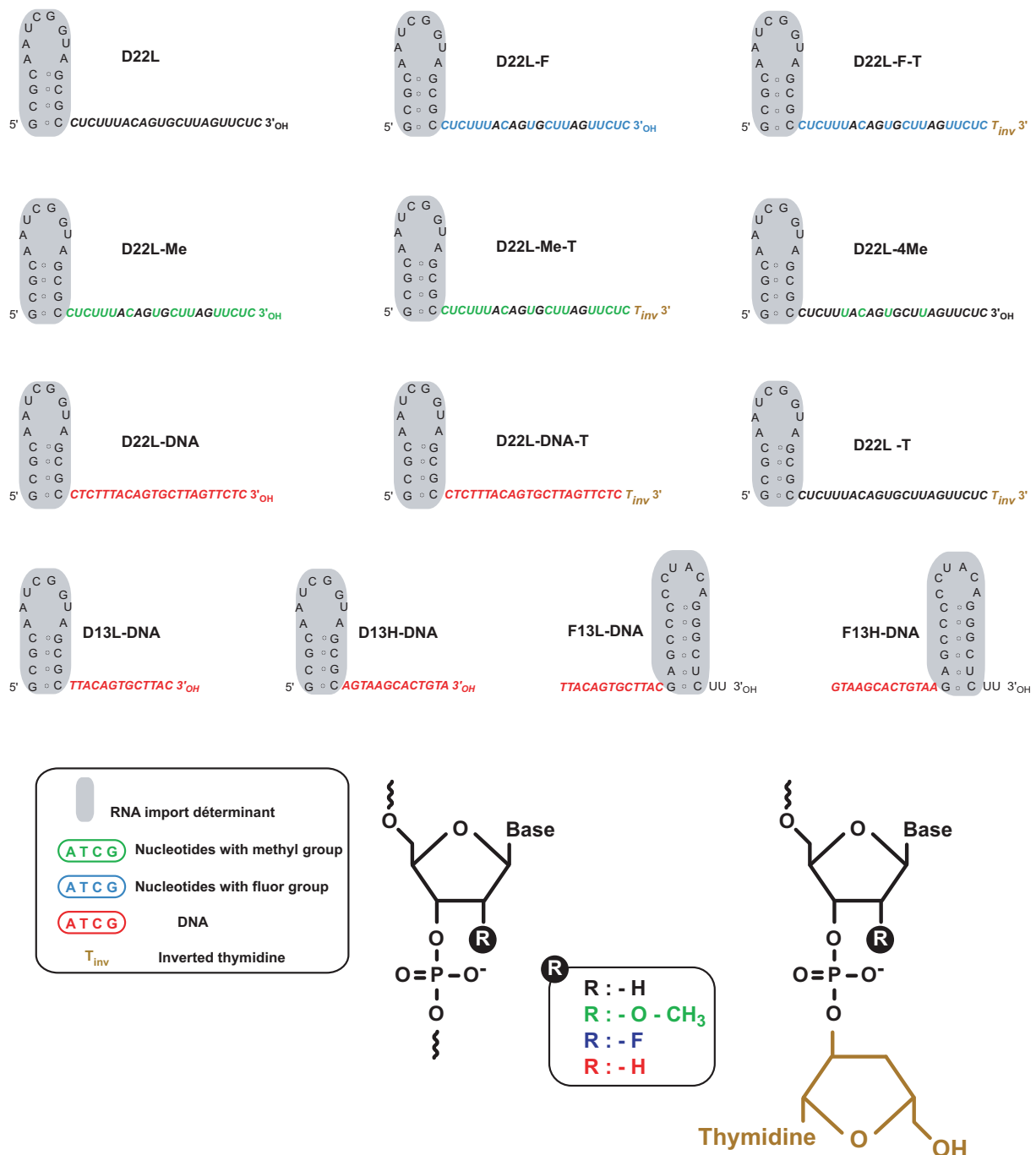


Fig. 1. Structures and nucleotide modifications of synthetic oligonucleotides used in the study.

Accessory Series II (Varian Inc., Australia) in a buffer containing 10 mM sodium cacodylate, pH 7.4, 150 mM NaCl and 2 mM MgCl₂. The oligonucleotides (2.0 μM each strand) were mixed, denatured by heating and subsequently cooled to the starting temperature of the experiment. The rate of temperature change was 0.5 °C/min. Duplex melting temperatures (T_m) were calculated using the thermodynamic parameters ΔH and ΔS that have been obtained by fitting procedure of UV–melting curves registered at two different wavelengths (260 and 270 nm) [15] according to the two-state model [16]. The parameter determination error did not exceed 5–10%. Specific hybridization with target mtDNA was tested using Southern-blot hybridization of wild type (nucleotides 15,251–

15,680 of mtDNA) and KSS (nucleotides 8099–8365/15,438–15,680 of mutant mtDNA) fragments with ³²P-labelled synthetic RNAs in 1xPBS at 37 °C as described previously [3].

3. Results

3.1. Stability of modified oligonucleotides in human cells

Chemical substitutions at the 2'-hydroxyl group with 2'-OMe, 2'-F and 2'-deoxy in combination with terminus capping chemistry often improve the stability of therapeutic oligonucleotides [17]. To test this methodology, we used a small artificial RNA D22L (Fig. 1),

which was previously shown to be imported into human mitochondria [18]. This molecule represents the fusion of the D-arm of imported tRNA^{Lys} (tRK1) [7] with a 22-nucleotide sequence corresponding to a fragment of human mtDNA at the boundaries of a large deletion found in patients with Kearns Sayre Syndrome (KSS) [3]. Since this anti-genomic part of the molecule (referred to as KSS-part) should be the most sensitive to nucleases, we synthesized a set of D22L derivatives containing substitutions at the 2'-hydroxyl group with or without addition of inverted 3'-3' thymidine nucleotide at the 3' terminus (Fig. 1). All the pyrimidine nucleotides of the KSS-part contained 2'-OMe and 2'-F groups in the versions D22L-Me and D22L-F correspondingly. In the D22L-4Me molecule, only four nucleotides localized in the nuclease-sensitive sites [17] contained the 2'-OMe groups. In D22L-DNA molecules, all the nucleotides of KSS-part were in 2'-deoxy form, thus forming a set of chimerical RNA–DNA molecules. We also synthesized and tested chimerical RNA–DNA molecules containing RNA F-hairpin structure as the mitochondrial import determinant [7] and DNA KSS-part of 13 nucleotides complementary to either H- or L-strand of mtDNA (F13H and F13L correspondingly).

All versions were tested for their stability in human cells. For this, cultured cybrid cells were transfected with synthetic oligonucleotides (referred to as SO). The transfection procedure did not lead to detectable decrease of viability of the cells, suggesting the absence of SO toxicity. The amounts of SO internalized by cells and their degradation rate was evaluated by Northern hybridization of total cellular RNA with specific probes at different time points spanning a 6-day period after transfection (Fig. 2). The non-modified RNA molecule D22L demonstrated a rather low stability in cells, characterized by a half-life period of 17.7 ± 0.8 h. On the other hand, protection of its 3'-terminus by inverted 3'-3' thymidine resulted in an increase of stability to 36.0 ± 1.5 h. Surprisingly, 2'-modifications of all the pyrimidine nucleotides in D22L-Me and D22L-F molecules did not lead to further increase of their stability comparing to D22L, while 2'-O-methylation in only four positions, representing the U-A, C-A and U-G sites, previously identified as major cleavage sites for serum endoribonucleases [19], resulted in a strongly increased lifetime of the D22L-4Me molecule. A strong effect on SO stability was also detected for molecules

containing a DNA KSS-part. For these chimerical SO, increased stability was detected if 3' terminus had been protected by RNA hairpin structure in F13L-DNA or by inverted 3'-3' thymidine in D22L-DNA-T (Figs. 1 and 2).

The above data indicate that an increase of anti-replicative molecules lifetime in transfected cells can be achieved either by the use of RNA–DNA chimerical versions and RNA molecules bearing 2'-OMe groups in nuclease-sensitive sites.

3.2. Mitochondrial import of SO and mtDNA heteroplasmy analysis

To determine the impact of modified nucleotides on the mitochondrial import of SOs, we compared the amounts of D22, D22-Me, D22-Me-T, D22-DNA and D22-DNA-T in purified RNase-treated mitochondria 2 days after transfection (Fig. 3). Hybridization data using SO-specific probes were quantified and normalized to the amounts of loaded mtRNA, estimated by hybridization with a probe to a mitochondrial transcript (mt tRNA^{Thr}). The results demonstrate that chemical modifications do not inhibit the mitochondrial import of the molecules. Moreover, for the versions contained 2'-OMe groups, we detected an increased efficiency of import in comparison with the non-modified RNA D22L. Amounts of chimerical molecules inside mitochondria were comparable to those of non-modified RNA D22L. Therefore, the presence of inverted thymidine at 3' terminus and modifications of ribose in KSS-part of SO had no negative effect on the mitochondrial uptake of these molecules, probably indicating on a correct interaction of the modified SO with protein import factors and mitochondrial membrane receptors and channels.

To induce a shift of the mutant mtDNA proportion, the therapeutic anti-replicative molecules should anneal in a very specific manner to mutant mitochondrial genomes, but not to wild-type ones. Predicted and experimentally measured melting temperature values for the hybrids between the SO and mutant KSS mtDNA show the increased stability of the duplex for chimerical and 2'-O-modified oligonucleotides comparing to D22 (Table 1). To assay the specificity of modified SO annealing to mtDNA, we performed Southern blot-hybridization of labelled SO with fragments of mutant and wild-type mtDNA at 37 °C in buffer containing

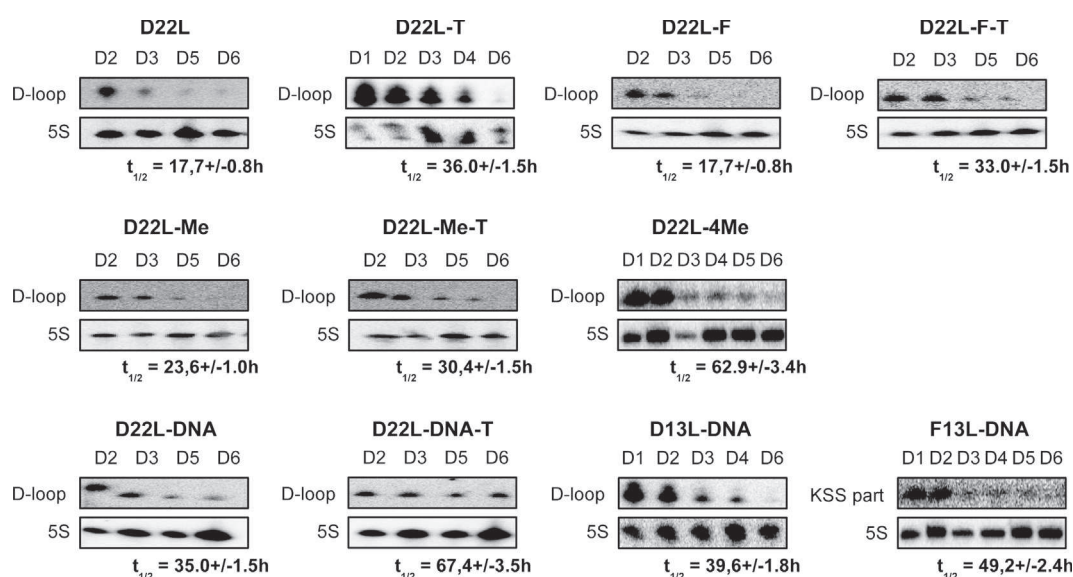


Fig. 2. Stability of synthetic oligonucleotides in transiently transfected cybrid cells. Northern hybridization of total RNA isolated in 2–6 days after cell transfection (“D2–6”, as indicated above the lanes) with various SO-specific ³²P-labelled probes (the SO is indicated above each panel, the probe – at the left). Probes used for hybridization: D-loop or KSS-part, specific for SO used for transfection; 5S, against 5S rRNA to quantify the level of SO in the cells. Below each panel, a half-life time for corresponding SO is indicated; ±SD was calculated from *n* = 3 independent experiments.

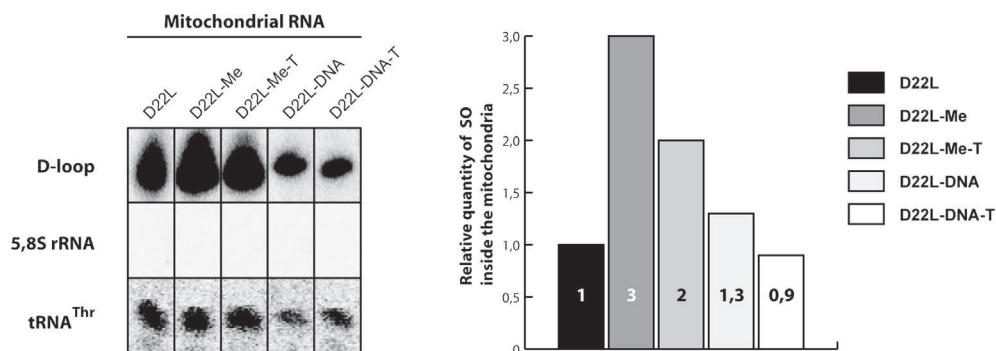


Fig. 3. Mitochondrial import of synthetic oligonucleotides in transiently transfected cybrid cells. On the left panel, an example of Northern hybridization of RNA extracted from purified mitochondria 48 h after transfection. Above the autoradiographs, SO used for transfection are indicated. On the left, hybridization probes: D-loop, specific for SO used for the transfection; 5,8S, against 5,8S rRNA to check the absence of cytosolic contamination in mitochondrial samples; tRNA^{Thr}, against mitochondrial tRNA to normalize the level of recombinant RNA to amount of loaded material. On the right panel, the diagram shows relative efficiencies of mitochondrial import. Import efficiency of D22L RNA was taken as 1. In all series \pm SD = 0.1, resulting from $n = 3$ independent experiments.

physiological concentrations of NaCl (150 mM) (Fig. 4). The results clearly demonstrate that all the SO analysed could hybridize only with mtDNA fragment containing the deletion boundaries, but not with the wild-type mtDNA fragment.

Modified SOs are thus capable to be targeted into human mitochondria in living cells and to anneal with the mutant form of mtDNA, so we anticipated to detect their effect on the KSS deletion heteroplasmy level. We therefore measured the percentage of mutant KSS mtDNA to all mtDNA molecules by real-time qPCR in cybrid cells transfected with various SO at different time points spanning a 6–8 day period after transfection (Fig. 5). Contrary to our expectations, only non-modified RNA D22H induced a reproducible decrease of heteroplasmy level by 20 \pm 2% with a 5–6 day delay in respect to the cell transfection. The effect had a temporal character, since the proportion of mutant mtDNA re-increased within 7–8 days after transfection, as it was previously shown for molecules containing two import determinants [3]. Among all the modified SO tested, only chimerical molecule D22-DNA induced a 15% shift of the heteroplasmy in 4 days after cell transfection. The other versions did not cause any significant effect on the heteroplasmy level. Therefore, the modifications of 2'-OH ribose group, as well as inverted thymidine residue added to 3' terminus, had a negative effect on the anti-replicative abilities of the SO, most probably due to the inability of the modified molecules to form correct and stable complex with mutant mtDNA *in vivo*.

4. Discussion

4.1. Stability of the modified oligonucleotides in human cells

Serum and cell homogenates are known to contain ribonucleases that belong to the RNase A-, 3'-exonuclease-, and phosphatase families, which cleave RNA more readily at sites within single strand regions and loops [19]. Modifications at the 2' position of the sugar ring, including 2'-OMe and 2'-F, confer to the oligonucleotide the capacity to adopt an RNA-like C3'-endo (N-type) sugar pucker, which is the most energetically advantageous conformation of RNA. Thus, such modifications increase Watson–Crick binding affinity and, due to the proximity of the 2'-substituent and the 3'-phosphate, improve nuclease resistance [20]. In full agreement with the expectation, the degradation rate of chimeric RNA–DNA molecules in human cells was much lower than that of non-modified RNA D22L. Protection of the 3' terminus by 3'-3' inverted thymidine was also very efficient for all the versions, indicating that 3'-exonucleolytic degradation has a very important impact on the SO decay in cells.

Surprisingly, we detected only a very slight increase in stability for the molecule D22-Me, in which all the pyrimidine residues bore 2'-OMe groups, and no effect of 2'-F groups in D22-F version. At the same time, methylation of four predicted nuclease-sensitive sites resulted in a very important increase of a half-life time of the D22-4Me molecule. To explain these data, one can hypothesize that

Table 1

Predicted and measured melting temperatures for hybrids between synthetic oligonucleotides (SO) and mutant (KSS) or wild-type (WT) mtDNA regions (SD = 2.7°).

SO	Homology with KSS mtDNA (b)	Measured T_m for KSS mtDNA (°C)	Predicted T_m for KSS mtDNA (°C)	Homology with WT mtDNA (5' deletion boundary) (b)	T_m for 5' boundary deletion (°C)	Homology with WT mtDNA (3' deletion boundary) (b)	T_m for 3' boundary deletion (°C)
D22L	22	50	52.1	12	34.4	11	33.5
D22L-Me	22	56	52.1	12	34.4	11	33.5
D22L-4Me	22	ND	52.1	12	34.4	11	33.5
D22L-Me-T	22	56.5	ND	12	ND	11	ND
D22L-F	22	62	ND	12	ND	11	ND
D22L-F-T	22	62.5	ND	12	ND	11	ND
D22L-DNA	22	61.5	62.8	12	45.3	11	43.5
D22L-DNA-T	22	61.5	ND	12	ND	11	ND
D13H-DNA	13	ND	50.8	7	21.2	7	20.2
D13L-DNA	13	ND	49.6	8	26.9	6	12.4
F13H-DNA	13	ND	49.6	6	12.4	8	26.9
F13L-DNA	13	ND	49.6	8	26.9	6	12.4

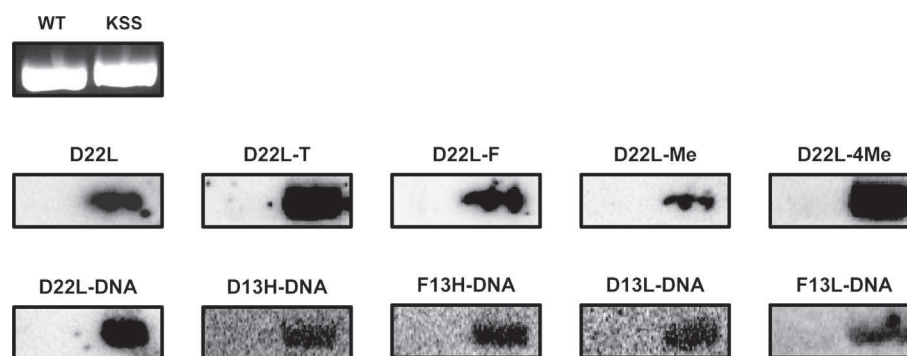


Fig. 4. Ability of synthetic oligonucleotides to discriminate wild type and mutant mtDNA. Southern hybridization of wild-type (WT) or mutant (KSS) mtDNA fragments with labelled SO (indicated above each panel) under physiological conditions. The Ethidium Bromide stained gel is presented in the upper panel.

modification of 16 pyrimidine nucleotides of 22-nucleotide anti-mtDNA part of the molecule might induce substantial changes in the geometry of RNA molecule, the instability of the D-helix and, therefore, the vulnerability of the 5'- part of the molecule. Noteworthy, modification of only 4 nucleotides did not disturb the structure of the D-arm, thus improving the stability of the whole molecule.

4.2. Mitochondrial import of modified oligonucleotides

To target SO molecules into mitochondria, we used the native RNA mitochondrial import, a pathway that appears to be the unique natural mechanism of nucleic acids targeting into these organelles. While protein mitochondrial import mechanisms are well studied, RNA trafficking into mitochondria is not totally understood due to the complexity of its mechanism and the variability between species. This pathway has been detected in phylogenetic groups as diverse as protozoan, plants, fungi and animals [21–23]. Several teams studied RNA structural determinants necessary for mitochondrial import and their implications for therapeutic purposes. Studies of tRNA import into mitochondria of *Leishmania tropica* resulted in a model of RNA targeting into mammalian mitochondria by use of the tag sequence comprising the 23-nucleotide D-arm of tRNA^{Tyr} and a protein complex RIC, detected only in this particular protozoan organism [24]. Another team proposed to use the 20-nucleotide stem-loop sequence of the RNase P RNA component (H1 RNA) as a signal, that enables longer fusion RNAs to be imported into human mitochondria [25].

We have developed several successful therapeutic cellular models based on import determinants of a yeast tRNA, tRK1 [26,27]. Recently, we demonstrated that anti-replicative ribonucleotides flanked by only one stem-loop structures, D or F, can be efficiently imported into human mitochondria *in vitro* and *in vivo* [18]. In the present study, we show that not only RNA, but also DNA oligonucleotides as well as sequences contained modified nucleotides can be efficiently imported into mitochondria of living human cells if flanked by an RNA stem-loop structure. We can hypothesize that such small hairpin RNA domains might be recognized by mitochondrial membrane proteins allowing subsequent translocation of RNA molecules into the organelles. Mammalian polynucleotide phosphorylase (PNPase), enzyme at least partially localized in the mitochondrial intermembrane space [28,29], may function as such an RNA receptor to recognize these import signals and to allow the translocation of correctly tagged “importable” RNA molecules.

4.3. The low anti-replicative capacity of modified oligonucleotides

Our data show that all of the ribose modifications used in the study, as well as inverted thymidine residue added to 3' terminus,

led to a loss of the anti-replicative activity of the oligonucleotides. This may be explained in several ways. First, the increased stability of RNA–mtDNA duplex might have a negative effect. To check this possibility, we synthesized a set of RNA–DNA chimerical molecules with a shorter, 13-nucleotide KSS-part (D13 and F13 versions, Fig. 1). The choice of the length was driven by melting temperature prediction (Table 1), aiming to adjust the T_m of the chimerical molecules to those of non-modified RNA D22L. Contrary to D22L and D22L-DNA, the chimerical molecules of D13 and F13 series had no effect on the heteroplasmy level, indicating that there is no direct correlation between the melting temperature of the duplex of SO with mutant mtDNA and the anti-replicative effect of SO.

The second possible explanation consists in non-specific annealing of SO not only to mutant mitochondrial genomes, but also to wild-type ones. Even if *in vitro* hybridization of all the modified SO with mutant mtDNA fragment was very specific, the situation *in vivo* might be different due to specific ionic conditions in the mitochondrial matrix and the implication of proteins. So far, the version D22-DNA, characterized by a high T_m of duplex with mutant mtDNA and also by rather high ($>37^\circ$) T_m values for 5' and 3' boundaries of KSS deletion (Table 1), was the only one among the modified SO that demonstrated the expected effect on the heteroplasmy level. This indicates that the predicted annealing with wild-type mtDNA does not correlate with the absence of the specific stalling of mutant mtDNA replication.

All these considerations led us to a conclusion that the most important feature could be the nature of the anti-replicative nucleic acid. Apparently, only oligoribonucleotide stretches complementary to the mutated region of mtDNA can significantly influence its replication by stalling the replisome progression. Deoxy-oligonucleotides are much less efficient, probably due to the ability of the mitochondrial replisome helicase to denature DNA–DNA hybrids, but not the regions of short RNA–DNA duplexes [30]. All the SO versions bearing ribose 2'-OH modifications and inverted thymidine residues revealed the total loss of anti-replicative efficiency. One can hypothesize that the C3'-endo sugar conformation and 3'-3' inverted nucleotides might be recognized by the replisome or by other mitochondrial nucleoid proteins as non-natural and quickly eliminated. The RITOLS model of mtDNA replication suggests the presence of displaced H-strand not in the single-stranded form, but essentially in the form of RNA–DNA hybrid [31]. Therefore, short RNA–DNA duplexes will not be eliminated by mitochondrial proteins and could cause a stall of the mutant mtDNA replication, leading to a shift in proportion between mutant and wild-type mitochondrial genomes.

The data presented here show that various nucleotide modifications protect RNA molecules introduced into human cells against nucleolytic degradation. Modified oligonucleotides fused to import determinants can be imported into mitochondria in living cells and

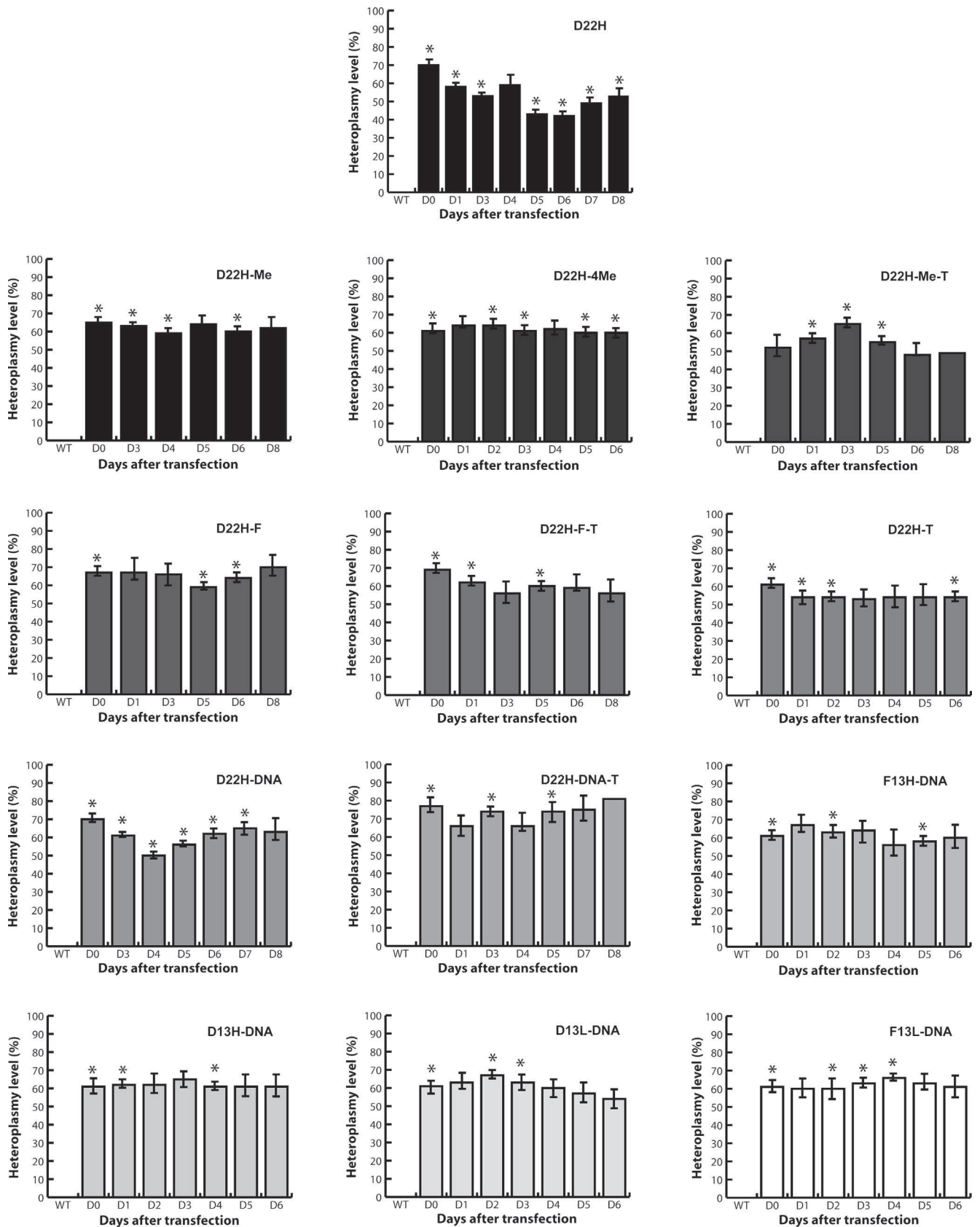


Fig. 5. Effect of synthetic oligonucleotides on heteroplasmy level in transfected cybrid cells. Time dependence of KSS deletion heteroplasmy level followed during 6–8 days after transfection of cybrid cells with various SO, indicated above each graph. \pm SD was calculated from at least three independent experiments; *, statistically significant data.

can specifically anneal with mutant mtDNA. However, despite their increased stability, such modified oligonucleotides are not likely to be used as anti-replicative therapeutic agents. Thus, the problem of the transient effect of short RNA molecules on the heteroplasmy level [3] should be resolved by other means. For instance, a stable expression of specific RNA molecules in the nucleus, or the use of a non-toxic transfection procedure, allowing several consecutive transfections of human cells with therapeutic RNA, may prove promising for the future progress of RNA-based approaches of the therapy of mitochondrial diseases.

Acknowledgements

The authors are grateful to Alexander Lomzov and Marsel Kabilov (Novosibirsk, Russia) for the thermal denaturation experiments. This work was supported by CNRS (Centre National de Recherche Scientifique); University of Strasbourg; AFM (Association Française contre les Myopathies); ANR (Agence Nationale de la Recherche); FRM (Fondation pour la Recherche Médicale); ARCUS/Suprachem collaboration program; LIA collaboration program (ARNmitocure) and Labex MitoCross (National Program "Investissement d'Avenir"). YT was supported by FRM and AFM PhD fellowships, ID – by Suprachem fellowship.

References

- [1] J.C. Burnett, J.J. Rossi, RNA-based therapeutics: current progress and future prospects, *Chem. Biol.* 19 (2012) 60–71.
- [2] D. Peer, J. Lieberman, Special delivery: targeted therapy with small RNAs, *Gene Ther.* 18 (2011) 1127–1133.
- [3] C. Comte, Y. Tonin, A.M. Heckel-Mager, A. Boucheham, A. Smirnov, K. Aure, A. Lombes, R.P. Martin, N. Entelis, I. Tarassov, Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre syndrome, *Nucleic Acids Res.* 41 (2013) 418–433.
- [4] R.N. Lightowers, P.F. Chinnery, D.M. Turnbull, N. Howell, Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease, *Trends Genet.* 13 (1997) 450–455.
- [5] A. Rotig, Genetic bases of mitochondrial respiratory chain disorders, *Diabetes Metab.* 36 (2010) 97–107.
- [6] D.C. Wallace, Mitochondrial DNA mutations in disease and aging, *Environ. Mol. Mutagen.* 51 (2010) 440–450.
- [7] O. Kolesnikova, H. Kazakova, C. Comte, S. Steinberg, P. Kamenski, R.P. Martin, I. Tarassov, N. Entelis, Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria, *RNA* 16 (2010) 926–941.
- [8] A. Smirnov, I. Tarassov, A.M. Mager-Heckel, M. Letzelter, R.P. Martin, I.A. Krasheninnikov, N. Entelis, Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria, *RNA* 14 (2008) 749–759.
- [9] C. Kohrer, L. Xie, S. Kellerer, U. Varshney, U.L. RajBhandary, Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells: a general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 14310–14315.
- [10] A.M. Mager-Heckel, N. Entelis, I. Brandina, P. Kamenski, I.A. Krasheninnikov, R.P. Martin, I. Tarassov, The analysis of tRNA import into mammalian mitochondria, *Methods Mol. Biol.* 372 (2007) 235–253.
- [11] L. Bellon, Oligoribonucleotides with 2'-O-(tert-butylidimethylsilyl) groups, *Curr. Protoc. Nucleic Acid Chem.* (2001) (Chapter 3), Unit 3.6.
- [12] J.F. Ortigao, H. Rosch, H. Selter, A. Frohlich, A. Lorenz, M. Montenarh, H. Seliger, Antisense effect of oligodeoxynucleotides with inverted terminal internucleotidic linkages: a minimal modification protecting against nucleolytic degradation, *Antisense Res. Dev.* 2 (1992) 129–146.
- [13] V.A. Efimov, S.V. Reverdatto, O.G. Chahmahcheva, Use of N-methylimidazole phosphotriester method for the synthesis of oligonucleotides useful in recombinant DNA studies, *Bioorg. Khim.* 9 (1983) 1367–1381.
- [14] N. Sugimoto, S. Nakano, M. Katoh, A. Matsumura, H. Nakamura, T. Ohmichi, M. Yoneyama, M. Sasaki, Thermodynamic parameters to predict stability of RNA/DNA hybrid duplexes, *Biochemistry* 34 (1995) 11211–11216.
- [15] D.V. Pyshnyi, A.A. Lomzov, I.A. Pyshnaya, E.M. Ivanova, Hybridization of the bridged oligonucleotides with DNA: thermodynamic and kinetic studies, *J. Biomol. Struct. Dyn.* 23 (2006) 567–580.
- [16] M. Petersheim, D.H. Turner, Base-stacking and base-pairing contributions to helix stability: thermodynamics of double-helix formation with CCGG, CCGGp, CCGGAp, ACCGGp, CCGGUp, and ACCGGUp, *Biochemistry* 22 (1983) 256–263.
- [17] A.A. Volkov, N.S. Kruglova, M.I. Meschaninova, A.G. Venyaminova, M.A. Zenkova, V.V. Vlassov, E.L. Chernolovskaya, Selective protection of nuclease-sensitive sites in siRNA prolongs silencing effect, *Oligonucleotides* 19 (2009) 191–202.
- [18] A. Gowher, A. Smirnov, I. Tarassov, N. Entelis, Induced tRNA import into human mitochondria: implication of a host aminoacyl-tRNA-synthetase, *PLoS One* 8 (2013) e66228.
- [19] D. Findlay, D.G. Herries, A.P. Mathias, B.R. Rabin, C.A. Ross, The active site and mechanism of action of bovine pancreatic ribonuclease, *Nature* 190 (1961) 781–784.
- [20] C.F. Bennett, E.E. Swayze, RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50 (2010) 259–293.
- [21] N.S. Entelis, O.A. Kolesnikova, R.P. Martin, I.A. Tarassov, RNA delivery into mitochondria, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 49 (2001) 199–215.
- [22] M.A. Rubio, J.J. Rinehart, B. Krett, S. Duvezin-Caubet, A.S. Reichert, D. Soll, J.D. Alfonzo, Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 9186–9191.
- [23] T. Salinas, A.M. Duchene, L. Marechal-Drouard, Recent advances in tRNA mitochondrial import, *Trends Biochem. Sci.* 33 (2008) 320–329.
- [24] B. Mahato, S. Jash, S. Adhya, RNA-mediated restoration of mitochondrial function in cells harboring a Kearns Sayre syndrome mutation, *Mitochondrion* 11 (2011) 564–574.
- [25] G. Wang, E. Shimada, J. Zhang, J.S. Hong, G.M. Smith, M.A. Teitell, C.M. Koehler, Correcting human mitochondrial mutations with targeted RNA import, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) 4840–4845.
- [26] N.S. Entelis, S. Kieffer, O.A. Kolesnikova, R.P. Martin, I.A. Tarassov, Structural requirements of tRNALys for its import into yeast mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 2838–2843.
- [27] O.Z. Karicheva, O.A. Kolesnikova, T. Schirtz, M.Y. Vysokikh, A.M. Mager-Heckel, A. Lombes, A. Boucheham, I.A. Krasheninnikov, R.P. Martin, N. Entelis, I. Tarassov, Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 8173–8186.
- [28] G. Wang, H.W. Chen, Y. Oktay, J. Zhang, E.L. Allen, G.M. Smith, K.C. Fan, J.S. Hong, S.W. French, J.M. McCaffery, R.N. Lightowers, H.C. Morse 3rd, C.M. Koehler, M.A. Teitell, PNPase regulates RNA import into mitochondria, *Cell* 142 (2010) 456–467.
- [29] V. Vedrenne, A. Gowher, P. De Lonlay, P. Nitschke, V. Serre, N. Boddaert, C. Altuzarra, A.M. Mager-Heckel, F. Chretien, N. Entelis, A. Munnich, I. Tarassov, A. Rotig, Mutation in PNP1, which encodes a polyribonucleotide nucleotidyltransferase, impairs RNA import into mitochondria and causes respiratory-chain deficiency, *Am. J. Hum. Genet.* 91 (2012) 912–918.
- [30] M. Bowmaker, M.Y. Yang, T. Yasukawa, A. Reyes, H.T. Jacobs, J.A. Huberman, I.J. Holt, Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 50961–50969.
- [31] T. Yasukawa, A. Reyes, T.J. Cluett, M.Y. Yang, M. Bowmaker, H.T. Jacobs, I.J. Holt, Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand, *EMBO J.* 25 (2006) 5358–5371.

III. Développement de la stratégie anti-génomique vis-à-vis de mutations ponctuelles

Avec l'obtention d'une diminution de l'hétéroplasmie suite à la transfection avec les ARN recombinants ciblant la large délétion KSS, nous avons pu prouver la validité de notre méthode qui constitue le premier exemple de stratégie anti-génomique *in vivo*. Forts de ce succès, nous avons souhaité étendre le champ d'action de nos ARN recombinants à d'autres types mutations, elles aussi associées à l'apparition de pathologies. Après avoir ciblé une large délétion créant un site unique au sein de l'ADNmt, nous avons voulu resserrer la spécificité d'action des ARN anti-génomiques envers des mutations ponctuelles. Dispersées au sein du génome mitochondrial, 3 mutations ponctuelles ont fait l'objet de mes travaux. C'est sur ce pan de mes recherches, qui a constitué la majorité de mon travail, que se consacre ce nouveau chapitre.

1. Développement d'une stratégie anti-génomique ciblant une mutation ponctuelle dans le gène de l'ARNt^{Leu}

1.1 Modèle d'étude

Lors des prémices du développement de notre stratégie, le choix du modèle d'étude a été l'un des éléments déterminants. Le caractère «unique» du site créé suite à l'apparition de la délétion en a fait un modèle de choix, l'insert anti-répliatif associé aux ARN pouvant cibler de manière spécifique l'ADNmt mutant. Dans le cas présent, la spécificité d'action des ARN anti-génomiques est plus difficile à prévoir, ceux-ci devant distinguer l'ADNmt mutant au nucléotide près. Enfin, le but de notre stratégie étant de traiter l'apparition d'une maladie mitochondriale, le choix d'une lignée cybride adaptée s'en trouve réduit, d'autant plus que celle-ci doit présenter un taux d'hétéroplasmie stable au cours du temps.

Pour développer la stratégie anti-génomique vis-à-vis de mutations ponctuelles, notre premier modèle fut celui d'une mutation affectant le gène de l'ARNt^{Leu} (A3243G), mutation la plus fréquemment associée à l'apparition du syndrome MELAS (King and Attardi, 1989), pathologie mitochondriale la plus répandue (Goto et al., 1990). Lors de notre étude, les tests *in vivo* ont été effectués sur des cellules cybrides qui résultent de la fusion d'une lignée cellulaire de type rho0 (cellules immortalisées d'ostéosarcome 143B.TK-) et de

cytoplastes de myoblastes provenant d'un patient porteur de la mutation A3243G dans l'ADNmt au niveau du gène codant pour l'ARNt^{Leu}(UUR). Ces cellules présentent un taux d'hétéroplasmie de 85±5% et ont été généreusement fournies par le Pr Robert Lightowlers (Université de Newcastle, Royaume-Uni). L'ensemble des contrôles a été effectué sur des cellules d'ostéosarcome humain de type 143B.TK- fournies par le Dr Eric Shoubridge (Institut Neurologique de Montréal, Canada), et ne contenant pas la mutation A3243G.

A présent la cible identifiée, il faut passer à l'étape de création de l'ARN anti-génomique. Mais pour qu'un tel ARN soit efficace et induise un effet sur l'hétéroplasmie, il doit remplir au préalable certaines conditions essentielles comme reconnaître de manière spécifique le génome muté et être efficacement importé dans les mitochondries.

1.2 Modélisation *in silico* des ARN anti-génomiques

La première étape, consiste à s'assurer que l'ARN respecte du point de vue structural le cahier des charges qui a conduit à la création des ARN dirigés contre la délétion. Pour cela, l'ARN doit comporter les 2 structures d'import, les boucles F et D (ou comme nous l'avons vu avec les ARN modifiés au moins une des ces structures) ainsi qu'un insert anti-répliatif simple brin. Ces ARN doivent donc conserver leur structure originelle lors de l'ajout de l'insert. Pour expliquer pas à pas la modélisation de ces ARN, je vais faire quelques régressions et décrire le processus de modélisation à partir de l'ARN minimal F1D1. Comme nous l'avons donc dit auparavant, l'ARN F1D1 est un ARN artificiel minimal dont la structure se compose uniquement des boucles F et D, déterminants d'import mitochondrial issus de l'étude de l'ARNt^{Lys} de levure (Kolesnikova et al., 2010), séparées par un linker de 3 nucléotides pouvant être remplacé par un insert anti-répliatif. Cet insert est l'élément variable de l'ARN, la séquence des boucles F et D ne pouvant pas être modifiée au risque d'en altérer la structure, il est alors inséré juste entre les 2 boucles ceci ayant également pour but de le protéger de l'action d'exonucléases.

Le choix de l'insert est tout d'abord guidé par sa température de fusion, calculée en utilisant différents programmes de prédiction tels OligoCalc (Kibbe, 2007) et Oligo Analyzer (IDT-DNA). Cette modélisation est effectuée en appliquant des paramètres de température et de concentration ionique proches des conditions physiologiques, la concentration en primer (se rapportant ici à la concentration de l'insert) est établie à 100 nM tandis que la

concentration en ions sodium Na^+ est fixée à 150 mM. Une fois la longueur fixée, nous définissons la première séquence en la faisant débiter par le nucléotide correspondant au site de la mutation ponctuelle puis nous en déduisons l'ensemble des autres séquences en déplaçant notre fenêtre d'un incrément de 1 nucléotide le long de chaque brin du génome mitochondrial jusqu'à ce que le point de mutation atteigne l'autre extrémité de la fenêtre définie (**Figure 39**).

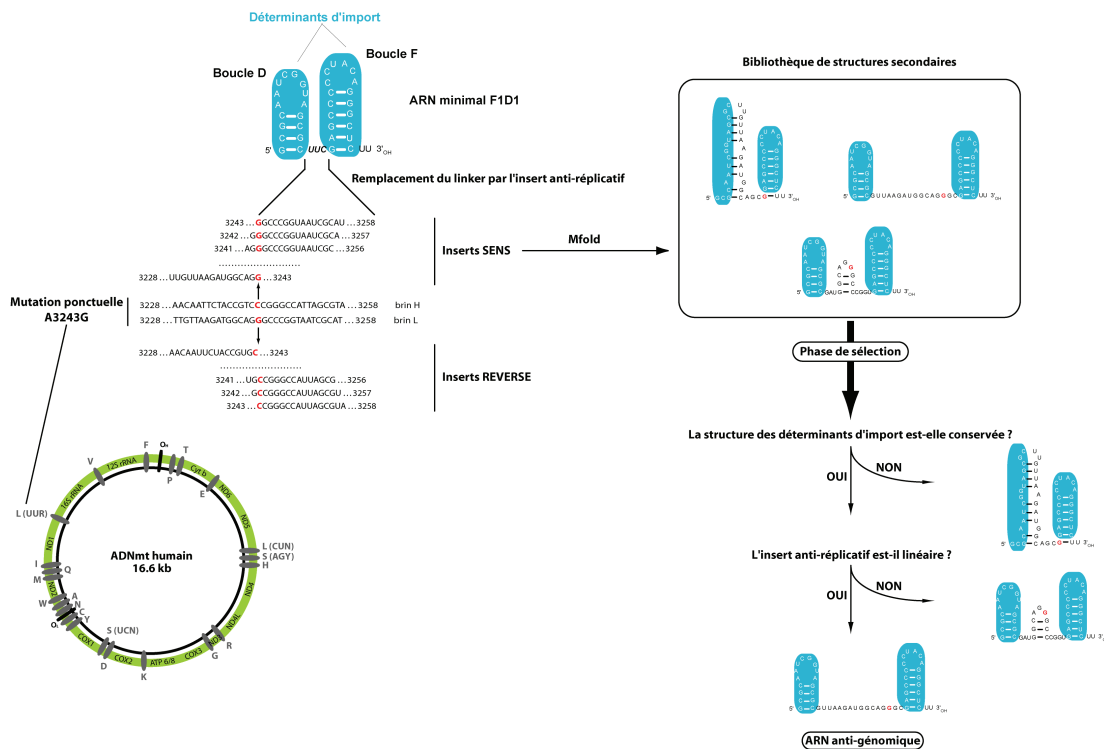


Figure 39 : Modélisation *in silico* des ARN anti-génomiques

Les grandes étapes du processus de modélisation d'un ARN anti-génomique. Les ARN sont conçus sur la base de l'ARN F1D1 dont les structures d'import sont représentées en bleu. Les inserts ciblent un brin ou l'autre de l'ADNmt au niveau de la zone où se situe le nucléotide muté (en rouge). Les structures ainsi générées sont passées au crible pour définir l'ARN anti-génomique retenu pour les analyses suivantes.

En pratique, si nous prenons le cas d'un insert de 10 nucléotides par exemple, nous obtiendrons au final une série de 10 séquences. A présent, ces séquences déterminées nous les fusionnons aux séquences correspondant aux 2 boucles d'import. Les séquences ainsi générées sont injectées dans un programme de modélisation permettant de prédire *in silico* l'organisation structurale des ARN. Dans un souci de vérification, 2 programmes sont utilisés Mfold (Zuker, 2003) et Oligo Analyzer (IDT-DNA) et les données recoupées pour voir les structures communes. Cette modélisation est également effectuée en appliquant des paramètres de température (et de concentration ionique lorsque c'est possible) proches des conditions physiologiques. De cette analyse, nous obtenons un pool de structures que nous

allons passer au crible pour ne garder que les ARN répondant à certaines normes. Celles-ci portent tout d'abord sur le maintien des structures d'import, tout ARN ne présentant pas ces déterminants sous leur forme native est exclu, des exemples de telles structures sont présentées dans la **Figure 39**.

Le second critère porte lui, sur l'insert. Comme nous venons de le dire, l'insert ne doit en aucun cas déstabiliser les structures d'import, mais ne doit pas non plus être lui-même dans une conformation défavorable. Son rôle étant de s'hybrider à l'ADNmt, une structure simple brin sans tige boucle interne est donc privilégiée. Là également, les ARN ne suivant pas cette règle sont exclus (**Figure 39**). Enfin, la dernière étape consiste normalement à vérifier si la séquence de l'insert présente une homologie avec l'ADNmt sauvage. Dans le cas présent, une analyse de type BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) ([Altschul et al., 1990](#)) est effectuée et montre une forte homologie envers le génome sauvage, ce qui en soit est attendu, celui-ci n'étant différent du génome mutant qu'à un nucléotide près. D'autres régions du génome présentent une homologie avec la séquence de l'ARN mais celle-ci diminue lorsque l'on augmente la taille de l'insert.

A l'issue de ce crible informatique, 13 ARN ayant un insert compris entre 8 et 20 nucléotides ont été retenus (**Figure 40**). Mais même si dans l'idéal, il serait souhaitable que les ARN répondent en tous points au cahier des charges, il est force de constater que certains ARN présentent une ou plusieurs structures secondaires alternatives qui ne répondent pas à l'ensemble des critères énumérés.

A présent en possession des séquences répondant sur le papier aux critères structuraux de nos ARN, ces derniers sont synthétisés *in vitro* pour passer la première étape de sélection et mettre à l'épreuve leur spécificité d'hybridation.

1.3 Etude de la spécificité des ARN vis-à-vis de la mutation ponctuelle A3243G

Dans le développement de notre stratégie anti-génomique et plus encore dans le cas d'une mutation ponctuelle, le point critique est la spécificité d'action des ARN le but étant de pouvoir faire la distinction entre 2 génomes et ce, même au nucléotide près dans le cas d'une mutation ponctuelle. Le premier test à effectuer est donc de déterminer si les ARN sélectionnés lors de l'étape de modélisation *in silico* sont capables de reconnaître de

manière spécifique l'ADNmt mutant, et uniquement celui-ci, même si de prime abord cette tâche semble revenir à chercher une aiguille dans une meule de foin. Pour le vérifier, retournons à nos ARN que nous avons synthétisés après l'étape de modélisation *in silico* (Figure 40).

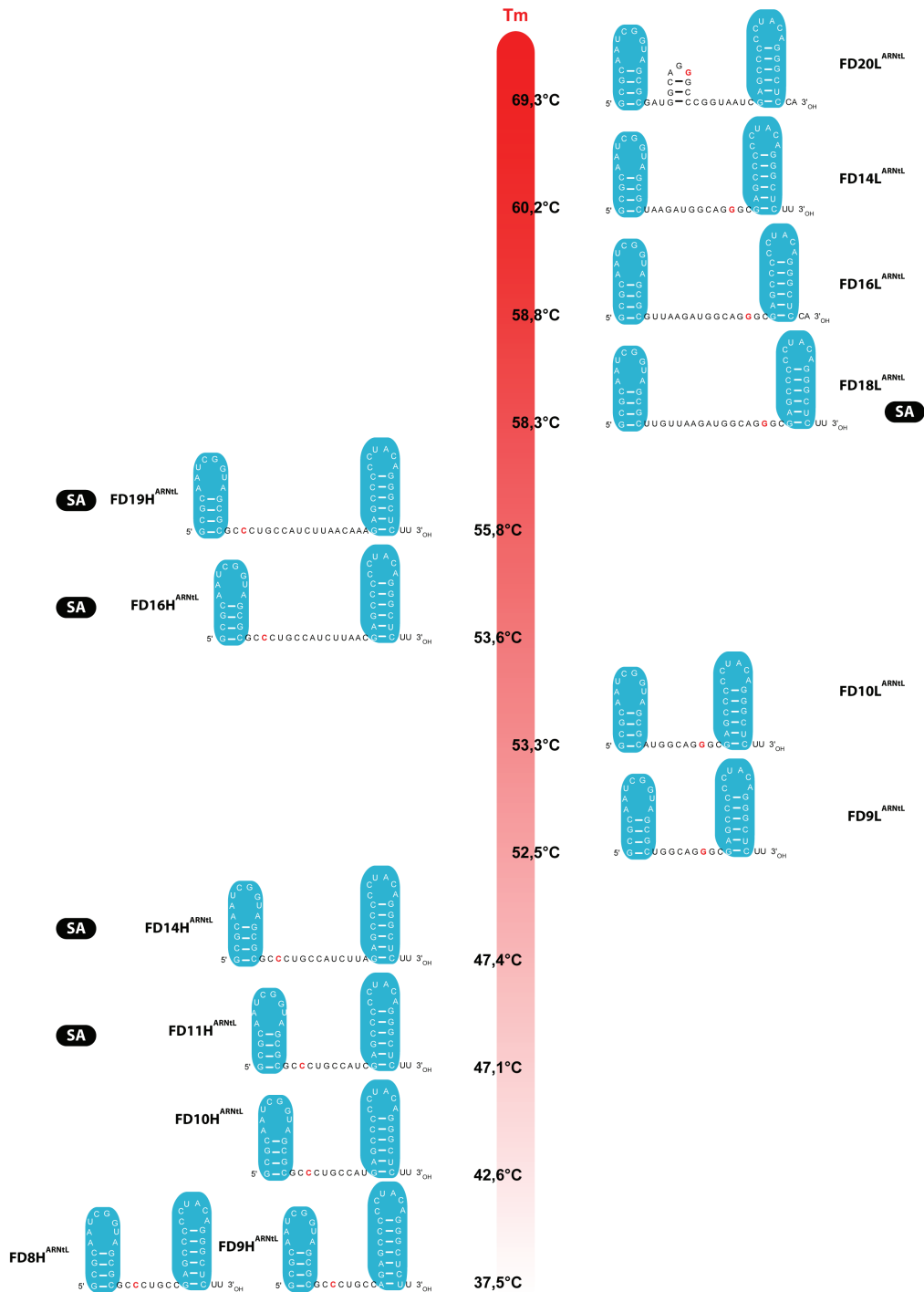


Figure 40 : Structure des ARN recombinants dirigés contre la mutation A3243G du gène de l'ARNt^{Leu}

Prédiction *in silico* de structures secondaires par le logiciel Mfold. Les ARN sont séparés en 2 catégories selon qu'ils s'hybrident au brin L (à gauche) ou au brin H (à droite). Au milieu est indiquée la température d'hybridation de l'insert avec l'ADNmt calculée par le logiciel Oligo Analyser (IDT-DNA). (SA) : existence de structures secondaires alternatives.

Pour déterminer la spécificité de ces ARN nous avons recours à une phase de sélection *in vitro* via une hybridation de type Southern. Pour cela, la région de l'ADNmt comportant la mutation est amplifiée par PCR et le produit de cette amplification déposé sur gel. En parallèle, cette même procédure est effectuée avec de l'ADNmt ne possédant pas cette mutation. Après avoir transféré sur membrane les fragments d'intérêt, celle-ci est mise en présence de l'ARN à tester, celui-ci étant marqué de manière radioactive au ^{32}P . Pour que cette situation reflète au mieux les conditions physiologiques, l'hybridation est réalisée à 37°C et dans un tampon PBS, nous plaçant ainsi dans des conditions d'isotonicité identiques à celles retrouvées dans les cellules humaines. Cette technique nous permet donc de tester si les ARN synthétisés sont capables de s'hybrider à l'ADN mais également de voir s'ils sont spécifiques de l'ADN mutant. Nous avons ainsi testé une douzaine d'ARN recombinants dirigés contre la mutation ponctuelle affectant le gène de l'ARNt^{Leu} (**Figure 41**).

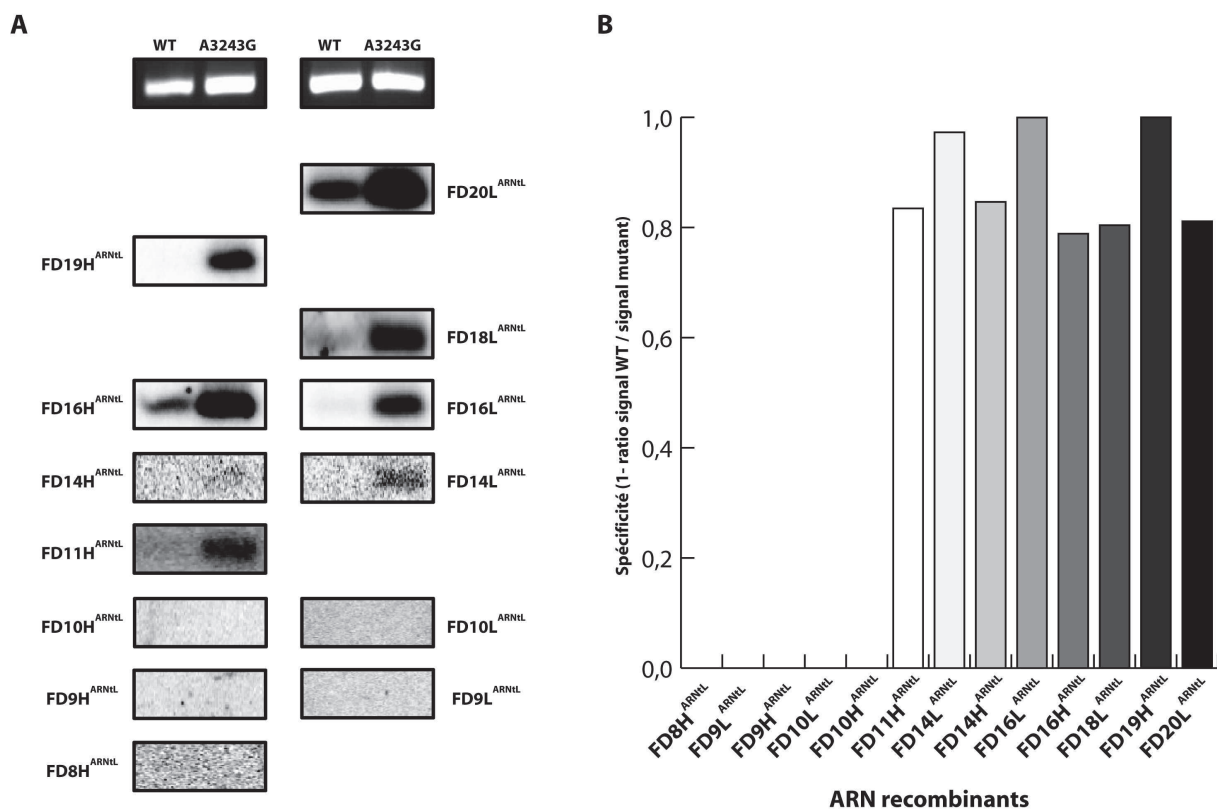


Figure 41 : Spécificité des ARN recombinants ciblant la mutation A3243G dans le gène de l'ARNt^{Leu}

(A) Hybridation Southern des ARN dirigés contre la mutation A3243G. Les ARN marqués ont été testés vis-à-vis de fragments d'ADN sauvage (WT) et muté (A32443G). (B) Représentation graphique de la spécificité respective de chaque ARN. Une valeur de 0 indique une absence d'hybridation et 1 une spécificité parfaite vis-à-vis de l'ADN mutant.

Nous constatons ainsi par l'expérimentation, que les inserts sous la barre des 11 nucléotides sont incapables de s'hybrider à l'ADN (sauvage ou mutant). A partir de cette longueur, les différents ARN testés montrent non seulement qu'ils peuvent s'hybrider à l'ADN mais également qu'ils sont capables de discriminer ADN sauvage et mutant avec une haute spécificité. Fait intéressant, on peut noter de légères différences dans la spécificité d'hybridation lorsque l'on compare des inserts de même taille mais ciblant l'un ou l'autre brin de l'ADNmt. En effet, si l'on compare deux à deux FD14H^{ARNtL} et FD14L^{ARNtL} ou FD16H^{ARNtL} et FD16L^{ARNtL}, on constate que ces ARN ne distinguent pas ADN sauvage et mutant avec le même niveau de spécificité. Pourtant, leurs inserts respectifs sont de même taille et complémentaires, s'hybridant donc à la même portion d'ADN, ce qui laisserait à penser que leur spécificité respective est équivalente alors que les versions ciblant le brin H arborent une spécificité moins importante. Cette diminution pourrait s'expliquer par le fait que ces versions présentent des structures alternatives, c'est-à-dire que pour une même séquence différentes structures secondaires peuvent coexister (**Figure 42**). Cette hypothèse est confirmée par les ARN FD11H^{ARNtL}, FD14H^{ARNtL} et FD16H^{ARNtL} qui présentent également des structures alternatives associées à une spécificité diminuée.

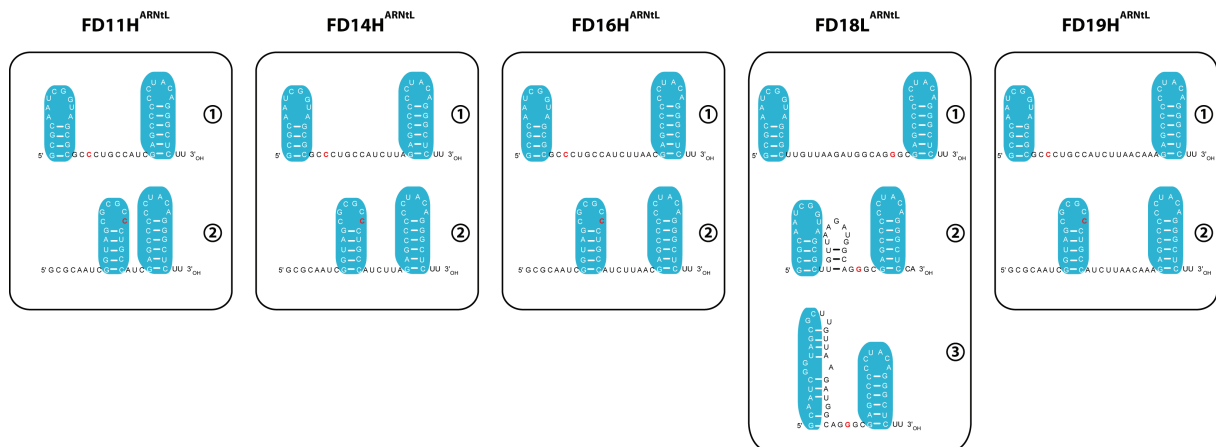


Figure 42 : Structures secondaires alternatives des ARN dirigés contre la mutation A3243G

Certains des ARN sélectionnés présentent des structures secondaires alternatives. La numérotation à droite de chaque ARN représente le nombre de ces structures alternatives.

Si l'on rapporte à présent ces résultats expérimentaux aux prédictions *in silico* des T_m, le lien n'est pas forcément évident. En effet, il faut rappeler que les valeurs des prédictions obtenues ne sont que théoriques et dépendent de l'algorithme utilisé, ainsi que des différents paramètres considérés (température, concentration ionique, concentration en matrice...) pour la modélisation. La présence de structures secondaires alternatives est une

autre preuve du biais d'une telle analyse. Donc même si les programmes de modélisation informatique nous permettent d'affiner notre choix dans la modélisation des ARN, ils ne constituent en rien une vérité absolue et ne reflètent pas les conditions qui s'appliquent *in vivo* ou même *in vitro*. Quoi qu'il en soit, il ressort tout de même de cette analyse que des ARN dirigés contre une mutation ponctuelle sont capables de s'hybrider de manière très spécifique à l'ADN mutant.

1.4 Etude de la capacité d'import mitochondrial

Après avoir pu prouver que les ARN dirigés contre une mutation ponctuelle sont capables de faire la distinction entre ADNmt sauvage et muté, il faut déterminer si ces derniers sont capables d'être importés au sein des mitochondries humaines. Etant donné que la structure des déterminants d'import a été conservée, les ARN modélisés contre la mutation ponctuelle devraient être tout aussi efficacement importés que ceux ciblant la délétion. Pour vérifier cela, des cellules cybrides porteuses de la mutation ponctuelle ont été transfectées avec les ARN recombinants dirigés contre le gène muté de l'ARN^{Leu} grâce à l'action d'un agent lipofectant et le contenu mitochondrial est ensuite analysé. Pour cela, les mitochondries sont soumises à un traitement à la RNase A et à la digitonine, qui a pour but d'éliminer toute trace d'ARN de la fraction cytosolique ainsi qu'au niveau de la membrane externe. Le contenu en ARN des mitochondries une fois extrait et purifié est déposé sur gel ainsi qu'une fraction de l'extrait total. Par une hybridation de type Northern, nous pouvons alors détecter la présence d'ARN recombinants dans les fractions cellulaires récoltées (mitochondriale et cytosolique) et ainsi observer l'import d'ARN au sein des mitochondries et estimer par la même leur niveau d'import relatif. Pour ce faire nous disposons de 3 sondes. La première ciblant un ARN cytosolique permet de vérifier le degré de pureté de notre préparation et de déterminer s'il y a eu contamination de la fraction mitochondriale par la fraction cytosolique. La seconde est quant à elle dirigée contre un ARN mitochondrial tandis que la dernière est spécifique de l'ARN recombinant étudié. Cette dernière comparée à l'hybridation avec la sonde mitochondriale permet de calculer l'efficacité d'import de l'ARN recombinant au sein des mitochondries et de le comparer à TRK1 ou à l'ARN minimal F1D1 (Figure 43).

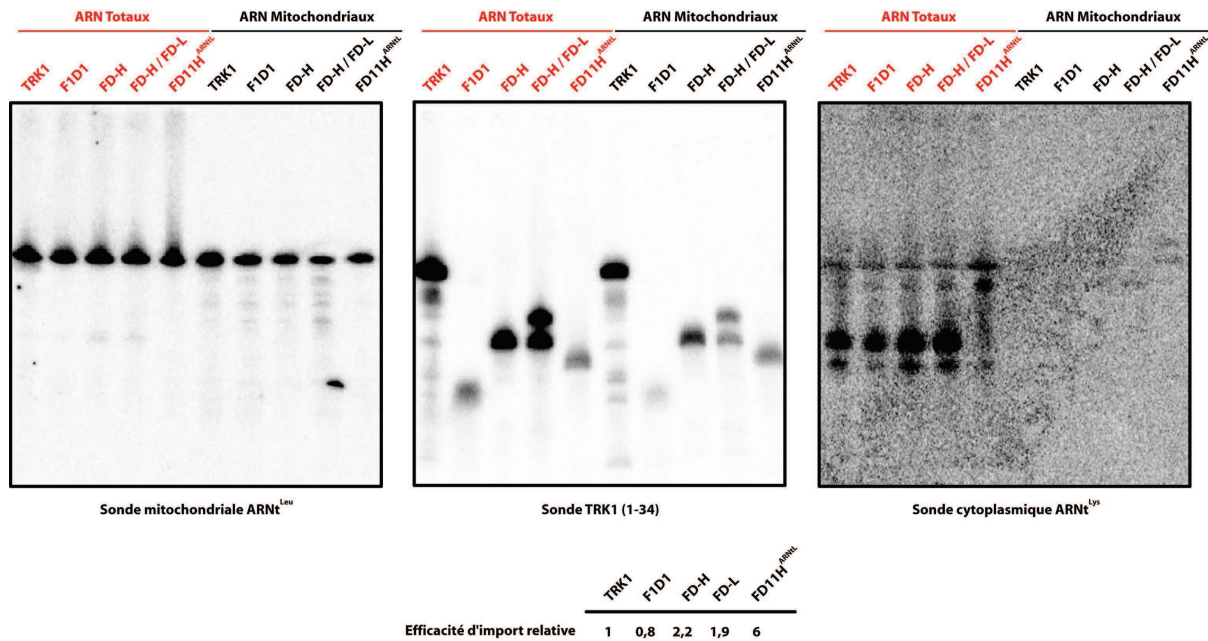


Figure 43 : Evaluation de l'efficacité d'import des ARN recombinants dans les mitochondries

Les différents ARN utilisés pour la transfection sont indiqués au-dessus de chaque panel. Les fractions d'ARN totale (en rouge) et mitochondriale (en noir) sont hybridées avec les sondes reconnaissant les différents ARN : mitochondrial (ARNt^{Leu}), recombinant (TRK1 1-34) et cytosolique (ARNt^{Lys}). L'efficacité d'import relative par rapport à TRK1 de chaque ARN est indiquée en dessous des gels.

Pour illustrer cette analyse, je présente ici les résultats relatifs à FD11H^{ARNtL}, premier ARN à avoir donné un signal positif du point de vue de la spécificité à l'encontre de la mutation ponctuelle A3243G. Son import a été comparé à celui de TRK1, des ARN FD-H et FD-L dirigés contre la mutation KSS et de F1D1, vecteur d'import minimal à l'origine de la création des ARN recombinants. Les résultats obtenus montrent que FD11H^{ARNtL} est efficacement importé au sein des mitochondries et ce avec une efficacité 6 fois supérieure à celle de TRK1 ou de F1D1. Pour expliquer ce fait, nous pouvons imaginer que l'augmentation de l'espacement entre les boucles d'import a un impact sur le taux d'import des ARN via un meilleur réarrangement conformationnel de la molécule. En effet, dans le cas de F1D1, seul 3 nucléotides servent de linker pour relier les 2 boucles d'import entre elles, ce qui contraint quelque peu la structure et génère un encombrement stérique dû à la proximité des 2 boucles d'import. Avec l'ARN FD11H^{ARNtL}, le linker est remplacé par un insert de 11 nucléotides qui laisse plus de flexibilité à l'ARN et rend les déterminants d'import plus accessibles pour sa prise en charge par les facteurs d'import. Si l'on considère les ARN FD-H (insert de 15 nt) et FD-L (insert de 22 nt), on arrive au même constat, l'efficacité d'import étant également supérieure à celle de TRK1 et F1D1 même si dans le cas présent, celle-ci n'est que 2 fois supérieure. Dans ce cas là, on peut considérer que cette différence dans le

niveau d'import est due à la présence de structures secondaires alternatives, des séquences plus longues conduisant à un nombre plus élevé de réarrangements structuraux. Mis bout à bout, ces observations vont donc dans le sens de notre hypothèse et confirment que la longueur de l'insert a un impact direct sur l'efficacité d'import.

Après avoir vérifié la spécificité et la capacité d'import des ARN dans les mitochondries, le dernier paramètre à analyser est l'impact de ces ARN sur le taux d'hétéroplasmie.

1.5 Etude de l'effet des ARN recombinant anti-ARN^{Leu} sur le taux d'hétéroplasmie

Pour pouvoir valider notre stratégie thérapeutique, le point clé qui doit être résolu est l'induction d'une baisse du taux d'hétéroplasmie *in vivo*. Donc même si les premiers obstacles ont été franchis avec succès, la dernière étape est probablement la plus délicate car elle implique de nombreux paramètres incontrôlables dus à l'aspect *in vivo* de la stratégie. Pour évaluer l'impact des ARN sur le niveau d'hétéroplasmie de notre mutation ponctuelle, nous avons du repenser la méthode de mesure de l'hétéroplasmie, une analyse par qPCR étant inapplicable dans le cas d'une mutation ponctuelle. Pour cela, nous avons appliqué une stratégie basée sur l'utilisation d'une enzyme de restriction et s'appuyant sur le fait que l'apparition de la mutation va induire la création d'un site de restriction (Holt et al., 1989). Cette méthode s'appuie sur l'analyse des fragments de restriction et permet d'établir le profil de digestion pour un échantillon donné et par extension d'en déduire le taux d'hétéroplasmie en établissant le rapport des fragments générés. D'un point de vue pratique, une aliquote d'ADN total (nucléaire et mitochondrial) est extraite de cellules cybrides transfectées avec l'ARN à tester puis soumis à une PCR. Après amplification de la région contenant le gène touché par la mutation, le produit de cette PCR est digéré par l'enzyme de restriction et déposé sur gel. Les fragments obtenus sont visualisés sous UV grâce à l'introduction de bromure d'éthidium, leur intensité mesurée par un logiciel adapté et le rapport entre fragments digérés et non digérés établi. Dans le cas de la mutation considérée, soit une transition d'une adénine en guanine, le site généré est reconnu par l'enzyme *ApaI* (GGGCC/C), seuls les fragments mutés donc porteurs de la mutation et ayant acquis le site de restriction seront coupés, les fragments correspondant à l'ADNmt sauvage ne seront quant à eux pas clivés (Figure 44). Les tests réalisés sur les cellules porteuses de la mutation A3243G ont permis d'établir le taux d'hétéroplasmie moyen à 85±5%.

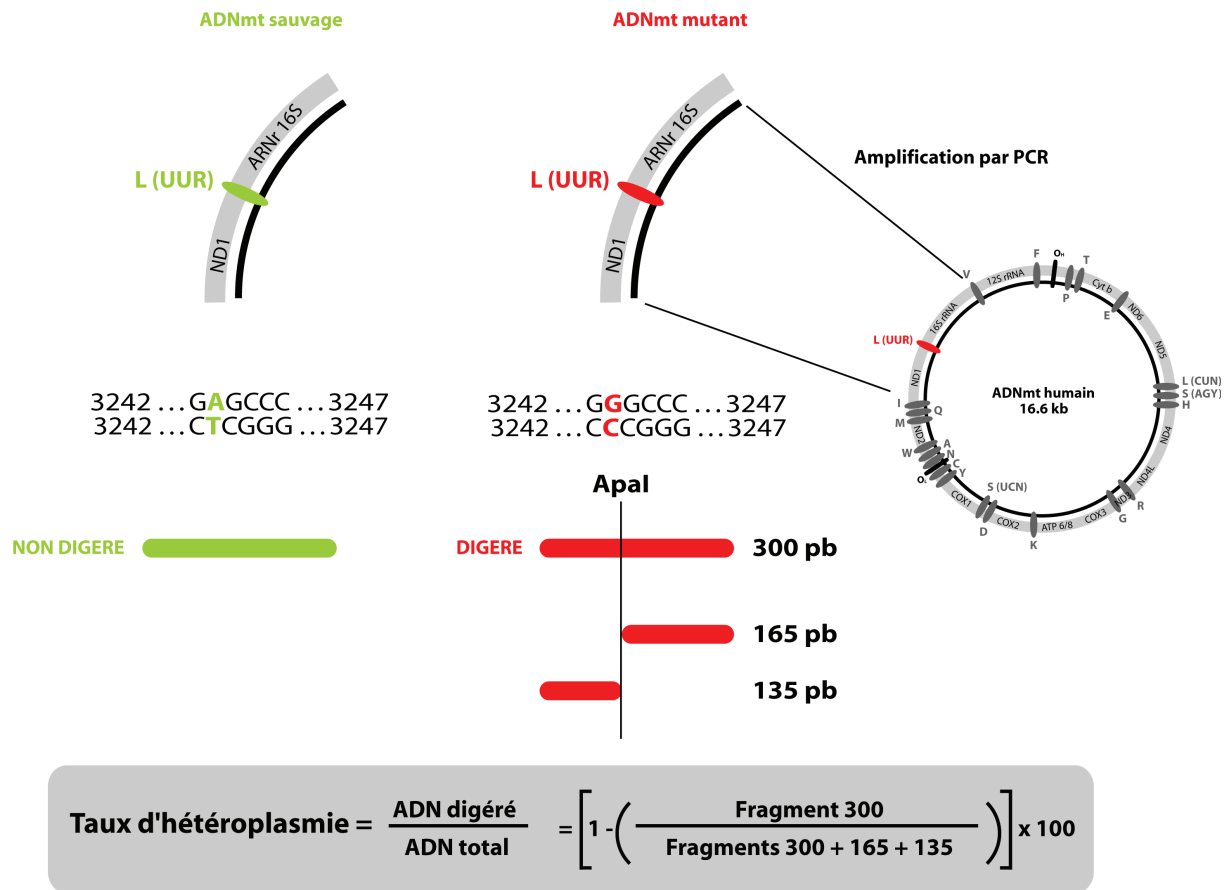


Figure 44 : Principe de mesure du taux d’hétéroplasmie par analyse des fragments de restriction pour la mutation A3243G

La zone de l’ADNmt contenant la mutation A3243G au niveau du gène de l’ARNt^{Leu} est amplifiée par PCR. Le produit issu de cette amplification est un fragment de 300 pb, digéré par l’enzyme de restriction *Apal* (GGGCC/C) qui clive uniquement les fragments d’ADNmt mutant (en rouge) mais pas l’ADNmt sauvage (en vert) et génère 2 fragments (165 pb et 135 pb). L’estimation du taux d’hétéroplasmie s’effectue en établissant le ratio entre le fragment de 300 pb et la somme des 3 fragments (300 pb, 165pb et 135 pb).

Pour évaluer l’effet de nos ARN sur le taux d’hétéroplasmie, des cellules cybrides porteuses de la mutation A3243G ont été transfectées. Les différents ARN utilisés présentent un insert compris entre 11 et 20 nucléotides et ciblent l’un ou l’autre brin de l’ADNmt mais tous montrent une spécificité conséquente vis-à-vis de l’ADNmt mutant (**Figure 40**). Nous avons ainsi utilisé des ARN les FD11H^{ARNtL}, FD14H^{ARNtL}, FD14L^{ARNtL}, FD16L^{ARNtL} et FD20L^{ARNtL}. En parallèle, les cellules ont également été transfectées avec un ARN contrôle (ARN TFV dont la structure est présentée **Figure 45**) possédant les structures nécessaires à son import au sein des mitochondries ainsi qu’un insert de 22 nucléotides mais dont la séquence ne présente aucune homologie avec l’ADNmt. A l’issue de cette analyse, on constate que cet ARN n’induit aucune diminution du taux d’hétéroplasmie et que malheureusement il en est de même pour les ARN anti-génomiques.

d'utilisation de ces ARN interférents pour les appliquer à notre modèle et définir la concentration adéquate à utiliser, vérifier l'effet sur l'expression de la protéine et la durée de cet effet. L'intérêt de cette analyse préliminaire est double car elle doit non seulement nous renseigner sur les conditions d'utilisation des siARN mais également nous permettre d'ajuster au mieux les conditions dans lesquelles nos ARN anti-génomiques doivent être utilisés en combinaison des siARN. Pour cela, les cellules cybrides ont tout d'abord été transfectées avec les siARN et ce, selon les conditions et les concentrations préétablies lors de l'étude menée par (Hyvarinen et al., 2007). Pendant 4 jours consécutifs à cette transfection, les cellules sont récupérées et le lysat mitochondrial extrait. Pour détecter la présence et estimer l'abondance relative de mTERF dans le lysat j'ai eu recours à une expérience de retard sur gel. Par cette technique, le fragment d'ADN préalablement marqué au ^{32}P est mis en présence de la protéine mTERF. Dans le cas d'une interaction entre les 2 partenaires, on observera alors un retard dans le profil de migration du fragment d'ADN correspondant à la formation d'un complexe ADN/mTERF et traduisant la quantité de protéine présente (**Figure 46**).

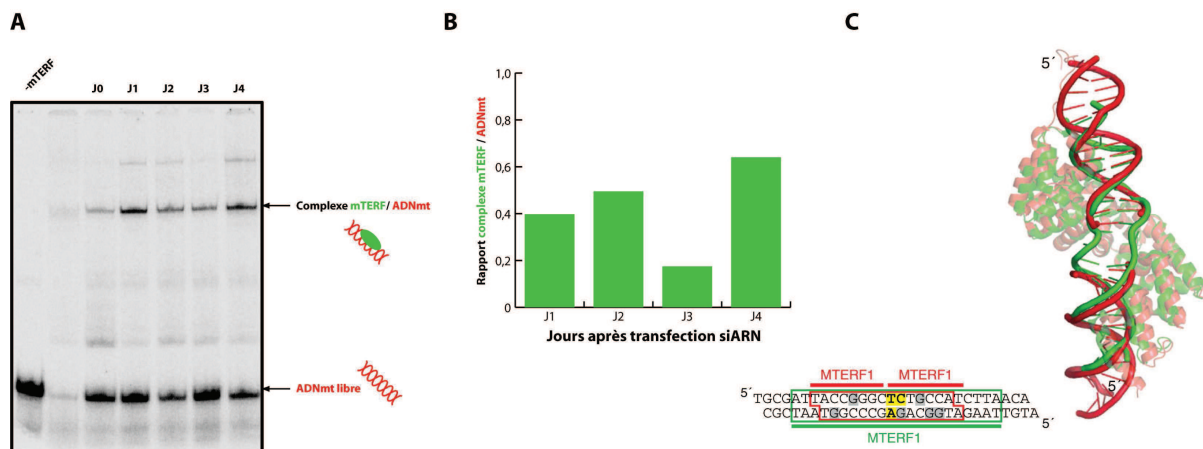


Figure 46 : Mesure du taux de protéine mTERF par expérience de retard sur gel

(A) Autoradiographie du gel de polyacrylamide natif. On peut observer le fragment d'ADNmt marqué libre ou sous forme de complexe avec le facteur mTERF. Le niveau standard d'ADNmt libre sans mTERF est indiqué par -mTERF. (B) Evolution du taux de facteur mTERF dans les cellules cybrides après transfection avec les siARN. Pour établir ce taux, on mesure le ratio entre le complexe et l'ADNmt libre. (C) Structure cristallographique de mTERF. La séquence reconnue par mTERF est représentée, avec la position A3243G de l'ARNt^{Leu} affectée par la mutation (en jaune) et les parties représentées sur la structure (rouge et vert). (Rubinson and Eichman, 2012).

Pour cette analyse, la concentration en ADN par réaction a été augmentée comme décrit dans (Fernandez-Silva et al., 1996) dans le but de saturer la capacité de fixation du facteur

mTERF. De plus, le gel a été chargé alors qu'il était sous tension et la migration effectuée dans le froid pour minimiser la dissociation du complexe et obtenir des bandes nettes adaptées pour la quantification.

Au vu de ces résultats on constate que le niveau de la protéine mTERF est diminué de 2 fois à partir au 3^{ème} jour suivant la transfection des cellules avec les siARN et qu'elle remonte immédiatement à partir du 4^{ème} jour. Pour tirer au mieux parti de cette inhibition, nous avons donc décidé de transférer les cellules de manière décalée, les précédents tests effectués sur la délétion KSS ayant montré que l'effet sur l'hétéroplasmie était visible à partir du 4^{ème} jour suivant la transfection. On a donc souhaité faire concorder ce jour avec l'effet maximal des siARN ayant lieu le 3^{ème} jour après la transfection, c'est pourquoi nous avons tout d'abord transfecté les cellules avec les ARN recombinants et que 2 jours après nous avons effectué la transfection avec les siARN. Suite à l'analyse des échantillons, nous constatons que même associé à l'action des siARN aucune diminution notable et prolongée du taux d'hétéroplasmie n'est observable (**Figure 47**), la diminution obtenue pour l'ARN FD16L^{ARN^{TL}} n'étant que transitoire, le niveau d'hétéroplasmie initial étant immédiatement recouvré 24h après cette baisse.

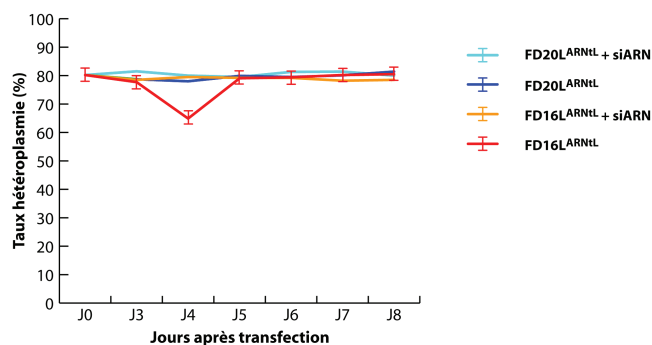


Figure 47 : Effet sur l'hétéroplasmie des ARN recombinants après ARN interférence

Le taux d'hétéroplasmie a été mesuré suite à une double transfection siARN/ARN recombinant (FD16L^{ARN^{TL}} et FD20L^{ARN^{TL}}). Malheureusement seule une faible diminution très transitoire du taux d'hétéroplasmie a pu être observée dans le cas de l'ARN FD16L^{ARN^{TL}}.

Toutefois ces derniers résultats sont à nuancer, car l'absence d'une diminution du taux d'hétéroplasmie pour cette mutation ne remet en rien en cause l'efficacité d'action des ARN recombinants. Rappelons que ces ARN ont la capacité d'être importés dans les mitochondries, qu'ils sont détectables dans les cellules plusieurs jours après la transfection attestant de leur stabilité. Enfin, fait des plus importants, ces ARN sont capables de s'hybrider à l'ADNmt mutant avec une forte spécificité, ce qui en ciblant une mutation

ponctuelle laisse présager de leur potentiel. De plus, dans le cas présent l'absence d'effet sur l'hétéroplasmie semble être due à un malheureux concours de circonstance, qui place la mutation étudiée au centre d'un processus compliquant véritablement l'accès des ARN à leur site d'hybridation. La baisse transitoire observée pour l'ARN FD16L^{ARN^{TL}} semble confirmer notre hypothèse et indiquer que dans le cas présent que c'est véritablement l'encombrement généré par mTERF qui pose problème et non l'ARN en lui-même. De plus, à terme, l'utilisation croisée de siARN et de nos ARN recombinants serait une procédure difficilement applicable et dont l'effet ne serait que transitoire. Dans de telles conditions, le modèle utilisé semble inadapté. Pour continuer le développement de notre stratégie, nous avons étudié d'autres mutations ponctuelles localisées en dehors de cette zone.

2. Développement d'une stratégie anti-génomique ciblant une mutation ponctuelle dans le gène de la sous-unité COX I

Pour poursuivre notre étude, nous avons donc décidé de diriger notre attention sur 2 autres mutations ponctuelles choisies dans des régions différentes du génome. La première d'entre elles, est une mutation ponctuelle affectant le gène *MT-CO1* codant pour une sous-unité de la cytochrome oxydase. Cette mutation A7339G située entre les 2 origines de réplication et à proximité de l'origine de réplication O_L , induit l'apparition d'un codon stop prématuré conduisant à un défaut dans l'assemblage du complexe respiratoire (D'Aurelio et al., 2001). Pour cette étude, les paramètres analysés ont été identiques aux précédents. Après une nouvelle phase de modélisation *in silico*, nous avons testé les ARN pour leur spécificité et leur stabilité, vérifié qu'ils pouvaient être importés efficacement au sein des mitochondries et enfin s'ils pouvaient induire un effet sur l'hétéroplasmie. Les cellules cybrides utilisées pour mesurer l'effet sur l'hétéroplasmie lors de cette seconde étude nous ont été fournies par le Pr Rudolf Wiesner (Centre de Physiologie et de Pathophysiologie, Cologne, Allemagne) et arborent un taux d'hétéroplasmie de l'ordre de $68 \pm 5\%$.

2.1 Structure et spécificité des ARN recombinants dirigés contre la mutation A7339G

Pour développer des ARN contre cette nouvelle mutation ponctuelle, la stratégie adoptée a été la même que celle présentée dans le chapitre précédent, je ne reviendrai donc

pas sur les détails ayant permis l'élaboration et le criblage des ARN modélisés. Pour cette mutation, nous avons décidé de restreindre notre crible aux inserts d'une longueur comprise entre 15 et 20 nucléotides. A l'issue de ce processus de sélection, seuls 2 jeux d'ARN dont les structures sont présentées **Figure 48** ont été retenus.

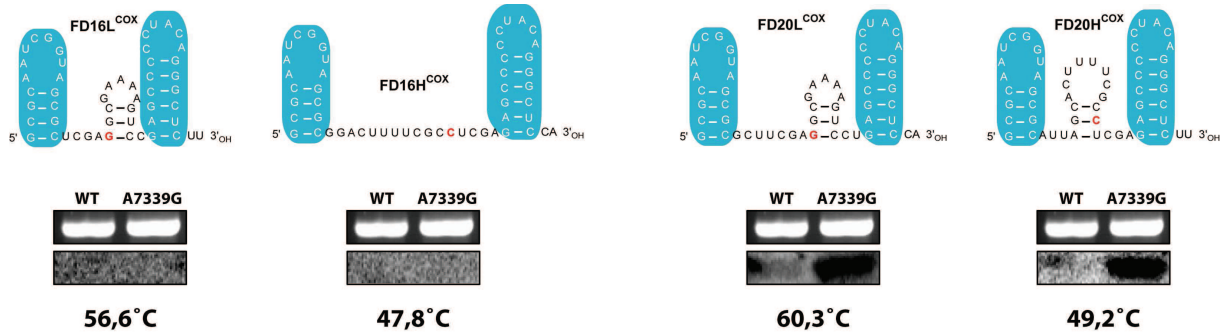


Figure 48 : Structure et spécificité des ARN recombinants dirigés contre la mutation A7339G

Les 2 jeux d'ARN ciblant la mutation ponctuelle A7339G ont un insert de 16 nucléotides (à gauche) et 20 nucléotides (à droite). Leur spécificité respective ainsi que le Tm prédit pour un duplex avec l'ADNmt muté sont indiqués en dessous. On constate que seuls les ARN ayant un insert de 20 nucléotides présentent une hybridation et une spécificité suffisantes.

Comme précédemment, l'efficacité de ces ARN a été testée pour leur capacité à reconnaître spécifiquement l'ADNmt mutant. Nous pouvons noter, selon les programmes de modélisation, l'éventualité d'une petite tige interne présente dans 3 de ces ARN, ce qui théoriquement pourrait poser problème pour l'hybridation. Malgré cela, on constate que cette hybridation est non seulement possible, mais est hautement spécifique pour chacune des versions de l'insert de 20 nucléotides. Face à cela, aucune hybridation, spécifique ou non n'a pu être détectée pour l'insert de 16 nucléotides, que ce soit pour sa version L ou H. Ainsi, seul le couple d'ARN FD20H^{COX} et FD20L^{COX} a été utilisé pour la suite de nos analyses.

2.2 Stabilité et import des ARN recombinants dirigés contre la mutation A7339G

Pour poursuivre notre étude de la mutation A7339G, nous nous sommes donc concentrés sur les ARN FD20H^{COX} et FD20L^{COX}. Nous avons ainsi analysé leur stabilité au sein des cellules et leur capacité d'import mitochondriale. Les résultats de ces analyses sont présentés **Figure 49**.

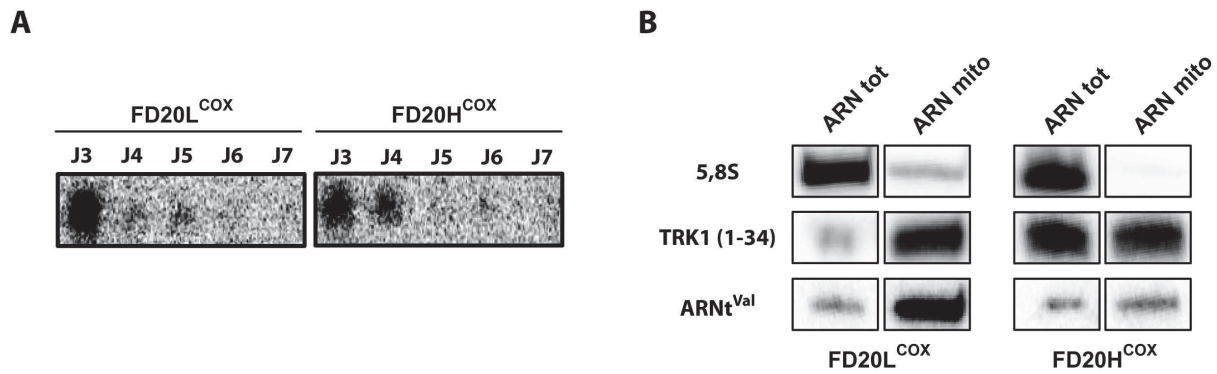


Figure 49 : Stabilité et import des ARN recombinants dirigés contre la mutation A7339G

(A) Hybridation Northern d'ARN total isolé de 3 à 7 jours après la transfection avec les ARN FD20L^{COX} et FD20H^{COX}. (B) Hybridation Northern d'ARN total et mitochondrial extraits de mitochondries purifiées 48h après transfection avec ARN FD20L^{COX} et FD20H^{COX}. Les ARN recombinants sont détectés dans les mitochondries tandis que la sonde 5,8S est utilisée pour vérifier l'absence de toute contamination dans l'extrait mitochondrial. La sonde dirigée contre l'ARN^{Val} mitochondriale permet de normaliser le taux d'ARN recombinant chargé sur gel.

Ces résultats montrent que les ARN ciblant la mutation A7339G sont détectables dans la cellule jusqu'à 6 jours après la transfection. Du point de vue de l'import, là encore les résultats obtenus sont comparables aux précédents, les ARN FD20H^{COX} et FD20L^{COX} étant efficacement importés au sein des mitochondries humaines après transfection. FD20H^{COX} et FD20L^{COX} semblent donc remplir les critères nécessaires au développement de notre stratégie, encore faut-il les tester pour leur capacité à induire une diminution du taux d'hétéroplasmie.

2.3 Etude de l'effet des ARN recombinants anti-COX I sur le taux d'hétéroplasmie

Pour évaluer le taux d'hétéroplasmie des cellules touchées par la mutation A7339G, nous nous sommes appuyés sur le même principe que celui développé pour la mutation ponctuelle précédente mais à une différence près. En effet, dans le cas de cette nouvelle mutation, la conversion de l'adénine 7339 en une guanine ne va pas induire la création d'un site de restriction mais sa disparition. Le site considéré ici est reconnu par l'enzyme *BstBI* (TT/CGAA) et a la particularité d'être présent en double exemplaire dans le fragment amplifié. Un de ces sites correspond à la zone mutée tandis que l'autre est un site ubiquitaire retrouvé dans toutes les molécules d'ADNmt. Dans le cas d'un fragment issu d'ADNmt sauvage, les 2 sites seront totalement clivés tandis que seul le site ubiquitaire sera clivé pour de l'ADNmt mutant (**Figure 50**). Si nous avons conservé ce site, c'est tout d'abord

pour nous assurer d'un site contrôle qui permet de vérifier que la totalité du fragment analysé est reconnu et coupé par l'enzyme de restriction, mais aussi pour éviter de générer des fragments trop courts qui auraient pu compliquer la quantification lors de la mesure du taux d'hétéroplasmie. Les tests réalisés via cette méthode ont ainsi permis d'établir le taux moyen d'hétéroplasmie à $68 \pm 5\%$ pour la lignée A7339G.

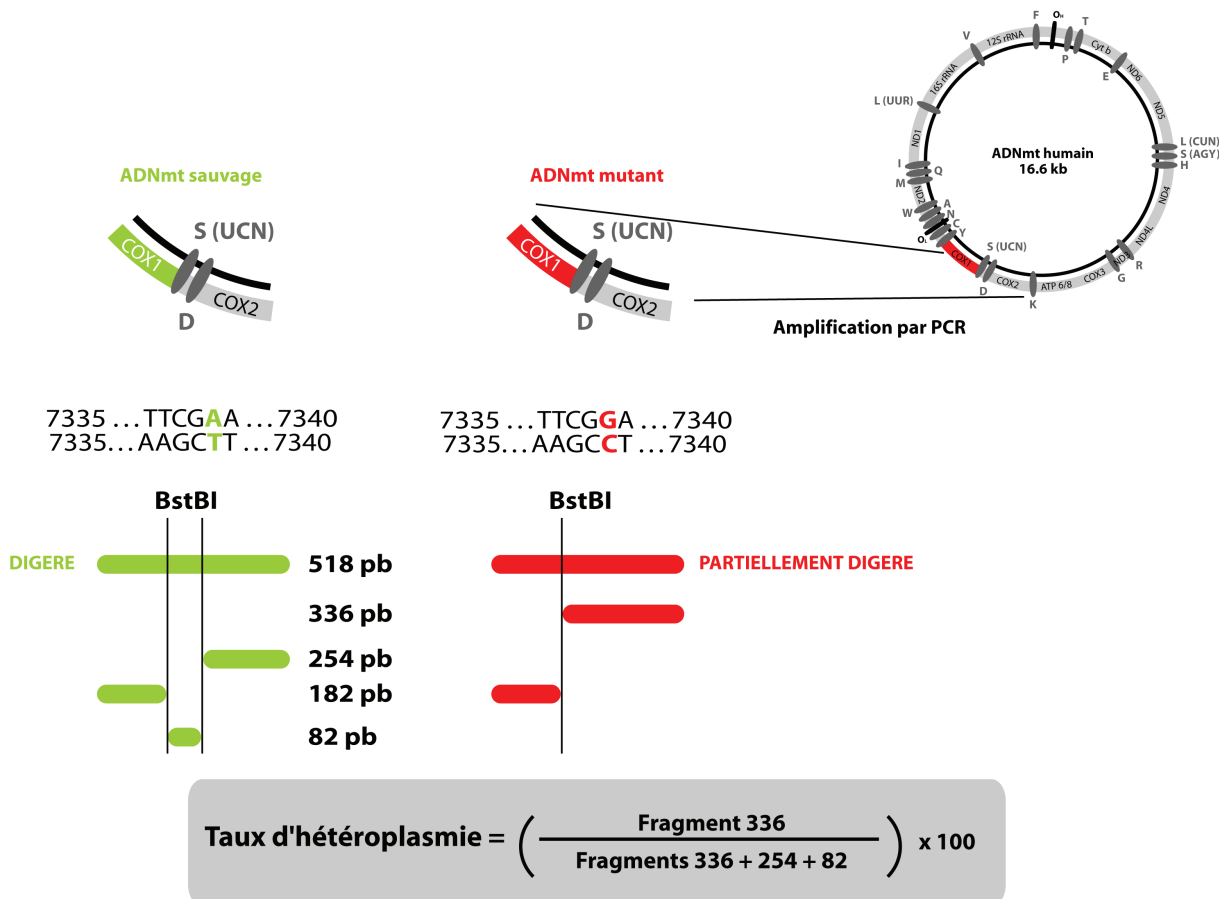


Figure 50 : Principe de mesure du taux d'hétéroplasmie par analyse des fragments de restriction pour la mutation A7339G

La zone de l'ADNmt codant pour la sous-unité COX I et contenant la mutation A7339G est amplifiée par PCR. Dans le cas d'ADNmt sauvage (en vert), le fragment possède 2 sites totalement clivés par l'enzyme de restriction *BstBI* (TT/CGAA). Pour de l'ADNmt mutant (en rouge), seul un de ces sites est clivé.

Les cellules cybrides porteuses de la mutation A7339G ont été transfectées avec les ARN FD20H^{COX} ou FD20L^{COX} et l'évolution du taux d'hétéroplasmie suivie pendant une période de 7 jours après transfection (**Figure 51**). Durant cette période, aucune diminution notable du taux d'hétéroplasmie n'a pu être observée.

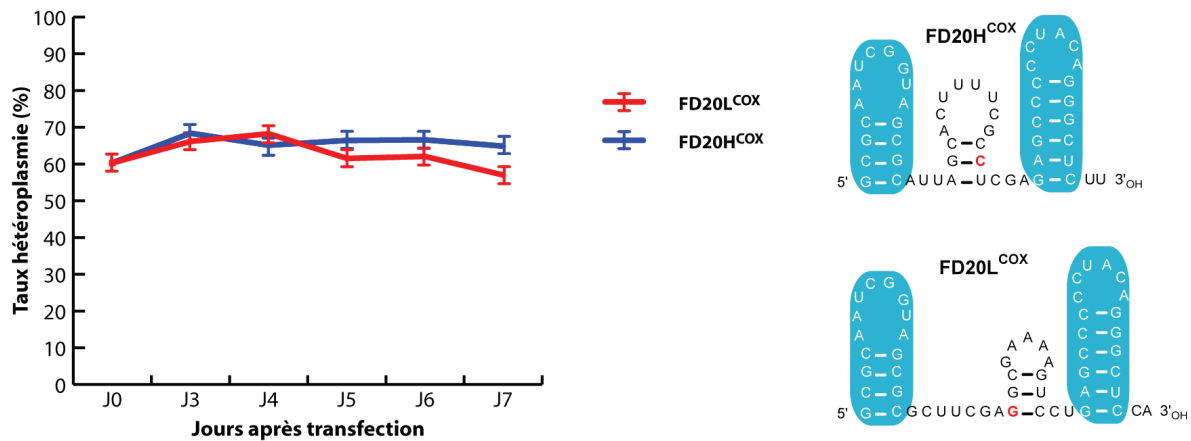


Figure 51 : Effet des ARN recombinants dirigés contre la mutation ponctuelle A7339G sur l'hétéroplasmie

(A) Evolution du taux d'hétéroplasmie après transfection transitoire des cellules porteuses de la mutation A7339G avec les ARN FD20L^{COX} et FD20H^{COX}. Le taux d'hétéroplasmie suivi sur une période de 7 jours mais aucune baisse n'est visible pour aucun de ces ARN. **(B)** Structure des ARN FD20L^{COX} et FD20H^{COX} utilisés lors de la transfection

Pour expliquer les raisons de ce revers, une des hypothèses viendrait à nouveau d'un possible encombrement stérique. En effet, comme nous l'avons dit en introduction à ce chapitre, la mutation étudiée se situe à proximité de l'origine de réplication O_L ce qui pourrait se traduire par un problème d'accessibilité à l'ADNmt ou encore un déplacement de l'ARN par la machinerie de transcription. La localisation de cette mutation au sein de l'ADNmt et l'impossibilité d'induire un changement semblent suggérer que position de la mutation ciblée au sein de l'ADNmt est d'une importance non négligeable.

3. Développement d'une stratégie anti-génomique ciblant une mutation ponctuelle dans le gène de la sous-unité ND5

En parallèle de l'étude menée sur la mutation A7339G, nous avons étudié une 3^{ème} mutation. Cette dernière est située au niveau du gène *MT-ND5* codant pour une sous-unité du complexe I (NADH déhydrogénase) et induit la conversion d'une adénine en guanine à la position nucléotidique 13514. Cette mutation se traduit par l'incorporation au niveau protéique d'une glycine en lieu et place d'un acide aspartique (D393G). Cette mutation a été retrouvée lors de sa caractérisation chez 2 patients ne présentant aucun lien de parenté, mais tous 2 atteints par un syndrome de type MELAS (Corona et al., 2001), suggérant l'importance de l'acide aminé D393 dans le fonctionnement du complexe I. Du point de vue cartographique, cette mutation se situe dans le premier quart du génome juste entre les 2

origines de réplication, ceci nous rapprochant des conditions obtenues lors de l'étude de la délétion KSS. Pour cette mutation, nous ne nous attarderons pas sur l'étude de la spécificité et de la stabilité, ces analyses étant expliquées de manière plus détaillée à la fin de ce chapitre avec l'Article n°4 présentant l'ensemble des données obtenues pour la mutation A13514G.

3.1 Structure et spécificité des ARN recombinants dirigés contre la mutation A13514G

Pour cette analyse, nous avons modélisé et synthétisé des ARN présentant un insert de 16 nucléotides (FD16H^{ND5} et FD16L^{ND5}), 20 nucléotides (FD20H^{ND5} et FD20L^{ND5}) et 25 nucléotides (FD25H^{ND5} et FD25L^{ND5}) ainsi que 2 molécules modifiées ayant un insert ADN (D20H^{ND5}-ADN et D20L^{ND5}-ADN) présentées dans la **Figure 52**.

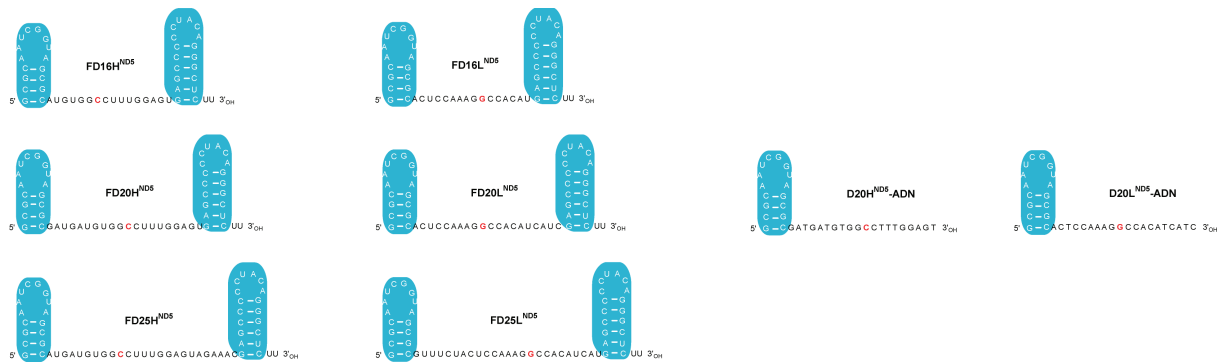


Figure 52 : Structures des ARN recombinants dirigés contre la mutation A13514G

Structures des 8 ARN ciblant la mutation ponctuelle A13514G. 3 longueurs d'insert ont été sélectionnées pour ces ARN : 16 ; 20 et 25 nucléotides. Les 2 ARN modifiés possédant un insert ADN sont présentés à droite.

La première étape a bien entendu consisté à tester leur spécificité à l'encontre de la mutation ciblée. Le résultat de cette analyse a permis de mettre en évidence que les versions ayant un insert de 20 nucléotides semblent être plus spécifiques dans le ciblage de l'ADNmt mutant. Ce sont donc ces molécules qui ont été utilisées pour la suite de nos analyses.

3.2 Stabilité et import des ARN recombinants dirigés contre la mutation A13514G

Dans le cas des ARN dirigés contre la mutation A13514G, les mesures montrent sans surprise que ces ARN sont détectables jusqu'à 6 jours après la transfection, l'ARN modifié D20L^{ND5}-ADN étant même plus stable que FD20H^{ND5} et FD20L^{ND5}. Pour étudier l'import de

ces molécules au sein des mitochondries, notre approche a été double cette fois-ci. Nous avons estimé le taux d'import selon la manière habituelle, après purification et extraction de l'extrait mitochondrial. Ces résultats sont comparables aux précédents, montrant que les ARN, même modifiés dans le cas de D20L^{ND5}-ADN, sont efficacement importés au sein des mitochondries. Mais pour observer ce mécanisme d'une autre manière et se rendre compte de la dynamique d'import de nos molécules dans les cellules humaines en culture, nous avons marqué l'un de ces ARN (FD20H^{ND5}) à l'aide d'uridine porteur d'un fluorophore de type Alexa 488. A l'aide d'un microscope confocal, nous avons alors pu suivre au jour le jour l'import de notre molécule et estimer son niveau de co-localisation au sein du réseau mitochondrial, celui-ci étant marqué au TMRM, un marqueur des mitochondries actives. L'estimation chiffrée de cette co-localisation a été établie grâce au coefficient de Pearson (Zinchuk et al., 2007) qui est un coefficient de corrélation linéaire entre 2 signaux. Sa valeur varie entre -1 et +1, une valeur négative indiquant l'absence d'une corrélation significative tandis qu'une valeur de +1 indique un niveau de co-localisation parfait entre les 2 fluorophores (Figure 53).

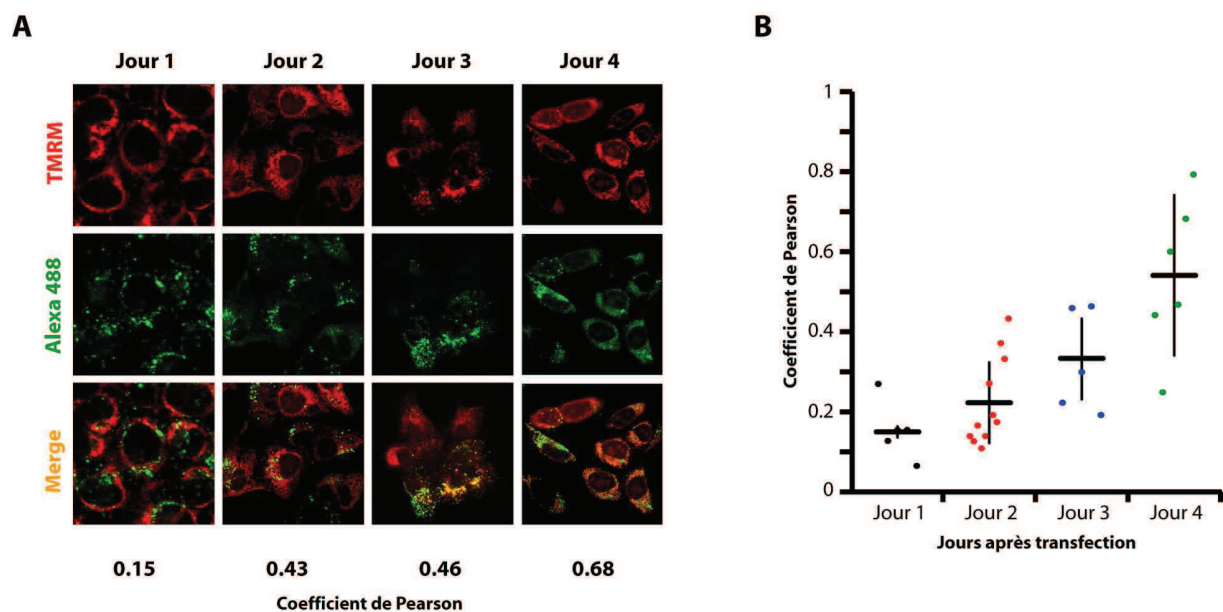


Figure 53 : Suivi de l'import de l'ARN FD20H^{ND5} dans des cellules humaines par microscopie confocale

(A) Images de microscopie confocale de cellules transfectées avec l'ARN FD20H^{ND5}. Cet ARN a été marqué à l'Alexa fluor 488 (coloration verte) tandis que les mitochondries ont été colorées au TMRM (coloration rouge). L'import est suivi pendant une période de 4 jours suivant la transfection en estimant le niveau de co-localisation de l'ARN au sein des mitochondries. (B) Mesure du coefficient de Pearson. Chacun des points représente une image dont le coefficient de Pearson a été calculé. On observe une augmentation progressive de la valeur de ce coefficient au cours du temps.

Ainsi, on observe 24h après la transfection, la présence de petites vésicules vert fluorescent, correspondant aux ARN marqués, emprisonnés dans les micelles créées par la lipofectamine. Une coloration diffuse est également observable au sein des mitochondries après ce laps de temps. Cette tendance va s'accroître au fil des jours, ce qui est confirmé par l'augmentation du coefficient de Pearson qui croît progressivement jusqu'à atteindre une valeur 0,7 au 4^{ème} jour suivant la transfection indiquant une co-localisation des ARN au sein des mitochondries et donc par conséquent l'import de l'ARN FD20H^{ND5} dans les cellules vivantes (**Figure 53**).

3.3 Etude de l'effet des ARN recombinants anti-ND5 sur le taux d'hétéroplasmie

Pour estimer l'impact des ARN FD20H^{ND5}, FD20L^{ND5} et D20L^{ND5}-ADN sur l'hétéroplasmie, nous nous appuyons sur l'usage d'un test dont le principe est identique aux précédents, l'enzyme *HaeIII* reconnaissant et clivant uniquement le fragment d'ADNmt mutant (**Figure 54**).

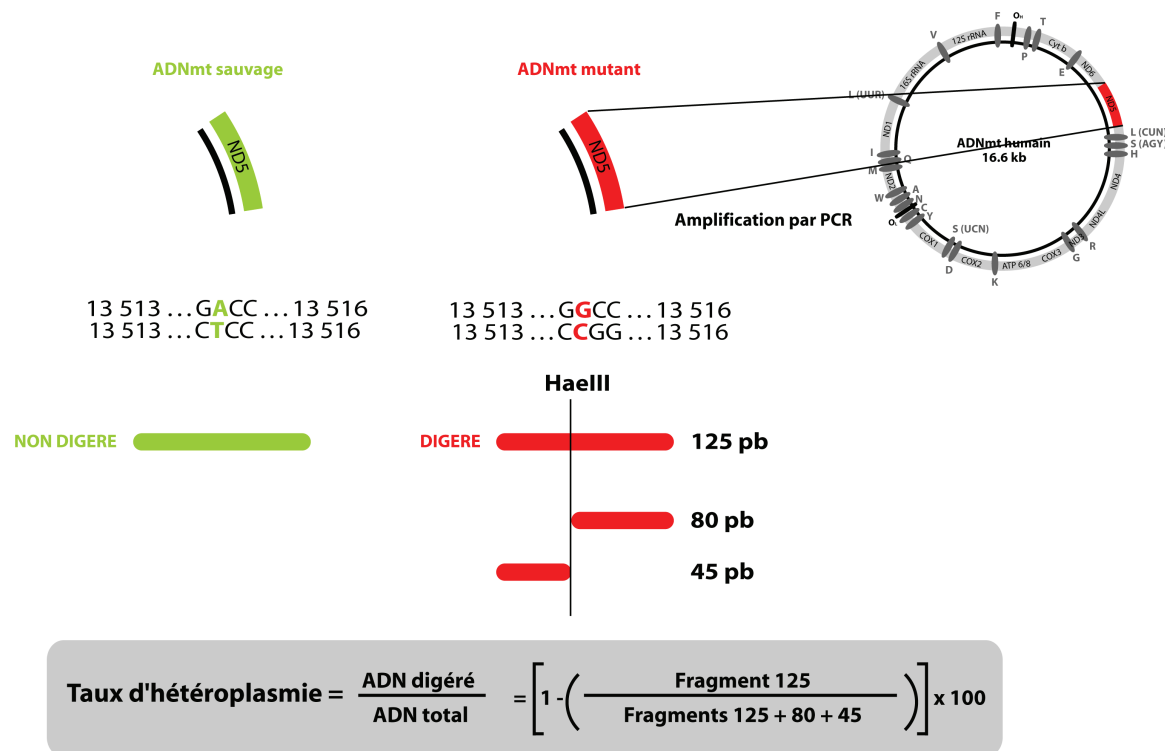


Figure 54 : Principe de mesure du taux d'hétéroplasmie par analyse des fragments de restriction pour la mutation A13514G

Une partie du gène codant pour la sous-unité ND5 est amplifiée par PCR. Le produit de cette amplification contenant la mutation A13514G est un fragment de 125 pb, digéré par l'enzyme de restriction *HaeIII* (GG/CC) qui clive uniquement les fragments d'ADNmt mutant (en rouge) mais pas l'ADNmt sauvage (en vert). L'estimation du taux d'hétéroplasmie s'effectue en établissant le rapport entre le fragment de 125 pb et les fragments issus de cette digestion (80 pb et 45 pb).

Nous effectuons ce test suite à une transfection des cellules cybrides à l'aide des 3 ARN sélectionnés (FD20H^{ND5}, FD20L^{ND5} et D20L^{ND5}-ADN). Dans le cas l'ARN modifié D20L^{ND5}-ADN, qui présente une haute stabilité dans les cellules et un import efficace au sein des mitochondries, aucune diminution du niveau d'hétéroplasmie ne peut être observée, le taux d'hétéroplasmie restant à 35±5%. Mais face à cela, nous observons une diminution reproductible du taux d'hétéroplasmie pour les cellules transfectées à l'aide de l'ARN FD20H^{ND5}. Cette diminution visible 3 jours après la transfection, se poursuit progressivement jusqu'à atteindre un niveau de près de 20% et ce 6 jours après la transfection. Pour FD20H^{ND5}, même si cette diminution n'est pas aussi conséquente, nous observons un taux d'hétéroplasmie diminué de l'ordre de 8 à 10% au bout de 7 jours (Figure 55).

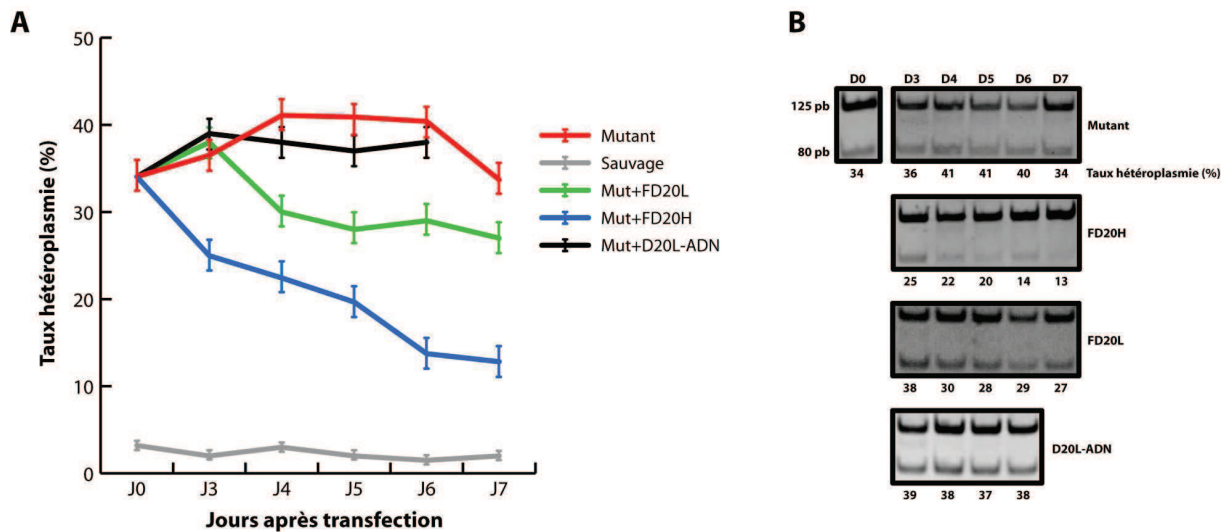


Figure 55 : Effet des ARN recombinants dirigés contre la mutation ponctuelle A7339G sur l'hétéroplasmie

(A) Evolution du taux d'hétéroplasmie après transfection transitoire avec les ARN FD20H^{ND5}, FD20L^{ND5} et D20L^{ND5}-ADN. On observe une diminution reproductible du taux d'hétéroplasmie d'environ 10% pour FD20L^{ND5} et d'un peu plus de 20% suite à la transfection avec FD20H^{ND5}. Aucune variation n'est visible pour D20L^{ND5}-ADN, le taux restant à la valeur moyenne mesurée pour des cellules mutantes non transfectées (Mut). (B) Exemple d'analyse RFLP pour les échantillons isolés 3 à 7 jours après la transfection avec les différents ARN considérés. Les taux d'hétéroplasmie pour chacun des jours sont indiqués en dessous de chaque panel.

Avec ces derniers résultats, nous avons en notre possession la preuve que des ARN recombinants sont capables d'agir comme des agents anti-réplicatifs vis-à-vis d'une mutation ponctuelle et de diminuer le taux d'hétéroplasmie au sein des cellules humaines.

 Article n°4**Modelling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by imported RNA targeting a pathogenic point mutation in mtDNA**

Yann Tonin¹, Anne-Marie Heckel-Mager¹, Mikhail Vysokikh^{1,0}, Ilya Dovydenko^{1,2}, Mariya Meschaninova², Alya Venyaminova², Ivan Tarassov¹ and Nina Entelis^{1*}

(Article en cours de soumission)

¹Department of Molecular and Cellular Genetics, UMR Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie (GMGM), CNRS – Université de Strasbourg, Strasbourg, France

²Laboratory of RNA Chemistry, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk 630090 Russia

⁰ Present Address: Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow 119991 Russia

Modelling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by mitochondrially addressed RNA targeting a pathogenic point mutation in mtDNA*

Yann Tonin¹, Anne-Marie Heckel¹, Mikhail Vysokikh^{1o}, Ilya Dovydenko^{1,2}, Mariya Meschaninova², Alya Venyaminova², Ivan Tarassov¹, and Nina Entelis¹

¹UMR 7156 Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie (GMGM), Strasbourg University - CNRS , Strasbourg 67084 France

²Laboratory of RNA Chemistry, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk Russia

*Running title : Mitochondrial import of RNA as a therapeutic tool

To whom correspondence should be addressed : Nina Entelis, UMR 7156 Université de Strasbourg-CNRS, 21 Rue René Descartes, 67084, Strasbourg, France; Tel (+33) 3 68 85 14 81; Fax (+33) 3 68 85 13 65; E-mail : n.entelis@unistra.fr

Keywords : Mitochondrial diseases; Mitochondrial DNA; Mitochondrial transport; RNA transport; Respiratory chain; Cell culture; Heteroplasmy; RNA-based therapeutics

Background: Point mutations in mitochondrial genome cause severe clinical disorders.

Results: We designed recombinant RNA molecules imported into mitochondria of human cells inducing a decrease of the proportion of mitochondrial DNA molecules bearing a pathogenic point mutation.

Conclusion: Imported recombinant RNAs can function as anti-replicative agents in human mitochondria.

Significance: This is a new approach for therapy of mitochondrial diseases.

ABSTRACT

Defects in mitochondrial genome can cause a wide range of clinical disorders, mainly neuromuscular diseases. Up to now, no efficient therapeutic treatment has been developed against this class of pathologies. Since most of deleterious mitochondrial mutations are heteroplasmic, meaning that wild type and mutated forms of mtDNA coexists in the same cell, the shift in proportion between mutant and wild type molecules could restore mitochondrial functions. Recently, we developed mitochondrial RNA vectors that can be used to address anti-replicative oligoribonucleotides into human mitochondria and thus impact heteroplasmy level in cells bearing a large deletion in mtDNA. Here we show that this strategy can be also applied to point mutations in mtDNA. We demonstrate that specifically designed

RNA molecules containing structural determinants for mitochondrial import and 20-nucleotide sequence corresponding to the mutated region of mtDNA, are able to anneal selectively to the mutated mitochondrial genomes. Being imported into mitochondria of living human cells in culture, these RNA induced a decrease of the proportion of mtDNA molecules bearing a pathogenic point mutation in the mtDNA ND5 gene.

RNA is increasingly used in therapeutic applications, including the agents of RNA interference, catalytically active RNA molecules and RNA aptamers that bind proteins and other ligands (reviewed in (1)). Here we use RNA molecules imported into human mitochondria to suppress negative effects of mutations in mitochondrial DNA (mtDNA). Involved in many metabolic pathways varying from cellular respiration to apoptosis, mitochondria are subcellular organelles essential for eukaryotic cells containing their proper genome, mtDNA. Human mtDNA is a closed circular double-stranded molecule of 16,5 kb able to replicate autonomously and encoding only 13 polypeptides, 2 ribosomal RNA (12S and 16S) and 22 tRNA, the vast majority of mitochondrial proteins and several RNAs being encoded in the nucleus and imported from the cytoplasm. Multiple alterations may occur in the mitochondrial genome (deletions, duplications, point mutations) resulting in severe impact on cellular respiration and therefore leading to

many diseases, essentially muscular and neurodegenerative disorders. To date, more than 250 pathologic diseases were shown to be caused by defects in mtDNA (2). The majority of these mutations are heteroplasmic, meaning that mtDNA coexists in 2 forms, wild-type and mutated, in the same cell. The occurrence and severity of pathologic effects depend on the heteroplasmy level, clinical symptoms appearing at the threshold of the order of 60 to 80%, depending on the mutation and the type of cells (3).

Various strategies have been proposed to address these pathologies, unfortunately for the vast majority of cases no efficient treatment is currently available. In some cases, defects may be rescued by targeting into mitochondria nuclear DNA-expressed counterparts of the affected molecules, an approach called allotopic strategy (4,5). Allotopic expression of mtDNA-encoded polypeptides has been demonstrated in yeast, but in mammalian mitochondria results are contradictory (reviewed in (6)). We have exploited RNA mitochondrial import pathway, which is the only known natural mechanism of nucleic acid delivery into mitochondria (reviewed in (7)), to develop two successful models of allotopic rescue of a mtDNA mutation by targeting recombinant tRNA into mitochondria (8,9).

Another strategy that might be termed as "anti-genomic", which consists in addressing into mitochondria endonucleases specifically eliminating mutated mtDNA, was also described (10,11). Another approach, referred to as anti-replicative, aims to induce a shift in heteroplasmy level by targeting specifically the replication of mutant mtDNA, thus giving a propagative advantage to wild type genomes. This strategy has first been tested *in vitro* using peptide nucleic acids (PNAs) with high affinity to mutant mtDNA (12). It was demonstrated that PNA oligomers complementary to mutant mtDNA can specifically inhibit its replication *in vitro*, however, it remained non-applicable to living cells due to impossibility to introduce PNA molecules into mitochondria *in vivo* (13). To overcome this obstacle, we proposed to use RNA mitochondrial import.

Analysis of the yeast tRNA^{Lys}_{CUU} mitochondrial import mechanism demonstrated that binding to mitochondrial targeting protein factors and subsequent RNA translocation across mitochondrial membranes require formation of an alternative structure, different from a classic

L-form tRNA model, characterized by bringing together the 3'-end and TΨC loop and forming the structure referred to as F-hairpin. Exploiting these data, we designed a short synthetic RNA comprising two domains of the yeast tRNA^{Lys}_{CUU} alternative structure, D-arm and F-hairpin (Fig. 1), characterized by a high efficiency of mitochondrial targeting (14). These molecules, fused to oligonucleotide stretches complementary to the mtDNA mutated region, were able to shift a heteroplasmy level in cells containing a large deletion in mtDNA, providing the first validation of the anti-replicative approach *in vivo* (15).

Here we show that this approach is not limited to large rearrangements in mtDNA, but can be applied to point mutations. We provide a protocol to design an oligonucleotide able to anneal to mtDNA bearing a point mutation but not to wild type one, and an original assay to test the specificity of hybridization *in vitro*. A series of recombinant molecules, including RNA-DNA chimera, have been tested for mitochondrial import in human cultured cells and their ability to induce a shift of the heteroplasmy level. We demonstrate that RNA molecules containing mitochondrial targeting determinants and a 20-nucleotide sequence corresponding to the mutated region of mtDNA, are able to selectively target mutated mitochondrial genomes. Being imported into mitochondria of cultured *transmitochondrial* human cells bearing a pathogenic point mutation in ND5 gene, these RNA significantly decreased the proportion of mutated mtDNA molecules.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Recombinant RNA modelling and synthesis – To predict secondary structures of recombinant RNA and estimate their free energy (dG), the *Mfold* (16), IDT Sci-Tools OligoAnalyser 3.1 and ViennaRNA platforms were used. To estimate melting temperatures for DNA–DNA and RNA–DNA duplexes, we used IDT Sci-Tools OligoAnalyser 3.1 software (17).

The recombinant RNAs were obtained by T7 transcription using the T7 RiboMAX Express Large Scale RNA Production System (Promega) on the corresponding PCR products and gel-purified. For PCR, the following oligonucleotides containing a T7 promoter (underlined) were used:

FDI6L (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC ACT CCA AAG GCC ACA TGA GCC CCC TAC AGG GCT C-

3'); *FD16H* (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC ATG TGG CCT TTG GAG TGA GCC CCC TAC AGG GCT C-3'); *FD20L* (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC ACT CCA AAG GCC ACA TCA TCG AGC CCC CTA CAG GGC TC-3'); *FD20H* (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GAT GAT GTG GCC TTT GGA GTG AGC CCC CTA CAG GGC TC-3'); *FD25L* (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GTT TCT ACT CCA AAG GCC ACA TCA TGA GCC CCC TAC AGG GCT C-3'); *FD25H* (5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC ATG ATG TGG CCT TTG GAG TAG AAA CGA GCC CCC TAC AGG GCT C-3') with primers T7 (5'-GGG ATC CAT AAT ACG ACT CAC TAT A-3') and FD-rev (5'-AAG AGC CCT GTA GGG-3').

To test the recombinant RNA annealing to target mtDNA, fragments of wild type and mutant mtDNA were amplified using primers hmtGluRT (5'-GTT CTT GTA GTT GAA ATA C-3') and CRC-F (5'-CAT ACC TCT CAC TTC AAC CTC C-3'), separated on 1% agarose gel, blotted to Hybond-N membrane and hybridized with ³²P-labelled recombinant RNAs in 1xPBS at 37°C. After PhosphorImager quantification (Typhoon-Trio, GE Healthcare), hybridization specificity was calculated for each RNA as 1 - (ratio between signals for wild type and mutated DNA fragments). Thus, for recombinant RNA annealed only to mutant DNA fragment, the hybridization specificity value reached 1, and for RNA annealed equally to mutant and wild type fragments, this value was close to 0. At least three independent experiments were performed for each RNA.

Chimeric oligonucleotides synthesis – Chimeric oligonucleotides D20L-DNA and D20H-DNA were synthesized on an automatic ASM-800 RNA/DNA synthesizer (Biosset, Russia) at 0.4 µmol scale using solid phase phosphoramidite synthesis protocols (18) optimized for this instrument. The DNA and 2'-O-TBDMS-protected RNA phosphoramidites and appropriate supports were purchased from Glen Research (USA). A 5-ethylthio-H-tetrazole has been used as activator with 5 and 10 min coupling steps, respectively. After standard deprotection, oligonucleotides were purified by 12% polyacrylamide/ 8M urea gel and

characterized by MALDI-TOF mass spectrometry (Autoflex III, Bruker Daltonics).

Synthesis of fluorescently labeled RNA transcript – Alexa Fluor 488-5 UTP (Molecular Probes) was incorporated into RNA during 2 h T7-transcription by T7-RNA polymerase (Promega). Reaction mixture of total volume 20 µl contained 0.5 µg of DNA template, 80 u of T7-RNA polymerase (2 additions of 40 u each), 0.5mM of ATP, 0.5mM CTP, 0.5mM GTP, 0.37mM UTP, 0.125mM Alexa Fluor 488-5-UTP, 10mM DTT and 40 u of RNaseOUT (Invitrogen). T7-transcript was purified by PAGE. To check the incorporation of the label in purified transcript, we compared the dye absorbance at 492nm with the absorbance at 260nm using NanoDrop ND1000 V3.5.2 Microarray software. The efficiency of labelling obtained was approximately two labeled uridines per one RNA molecule.

RNA FD20H, used for the microscopy, contains 13 uridine residues (Fig. 2): one at the end of F-stem region, three in the loops and nine in the anti-replicative part of the molecule, which is not responsible for the mitochondrial import efficiency. Therefore, the labelling should not significantly alter the secondary structure and mitochondrial import of the RNA molecule.

Transient transfection of cybrid cells – Transmitochondrial cybrid cell lines obtained by fusion of fibroblast-derived cytoplasm from patient and a 143B rho^o cell line (19) were kindly provided by M. Zeviani (National Neurological Institute 'Carlo Besta' of Milan). Cells were cultivated at 37°C and 5% CO₂ in DMEM (Sigma) containing 4,5g/L of glucose supplemented with fetal calf serum (Gibco), penicillin/streptomycin, uridine (50 mg/L) and fungizone (2,50 mg/L) (Gibco).

Transient transfection of cybrid cells with RNA and chimeric molecules was performed as described in (20,21), with a minor modification: for 2 cm² well of 80% confluent cells, we used 0.25 µg RNA. Transfections were performed with the Lipofectamine 2000 in OptiMEM medium (Invitrogen), as proposed in the supplier's protocol. OptiMEM was changed to a standard DMEM medium 8 hours after the transfection. Transfection procedure did not lead to detectable decrease of viability of the cells or to a significant change of the overall mtDNA amount verified by real-time qPCR as described (15).

RNA stability and mitochondrial import in vivo – Mitochondria were isolated from the cybrid cells as described earlier (22,23), treated with digitonin to generate mitoplasts (mitochondria devoid of the outer membrane) and RNase A to get rid of non-specifically attached RNA. Such a treatment allows to obtain mitochondria free of cytosolic RNA contamination, which was tested using a probe for cytosolic 5.8S rRNA, normally strongly attached to the outer mitochondrial membrane upon cell disruption. Total and mitochondrial RNA was isolated with TRIzol reagent (Invitrogen).

Stability and mitochondrial import of recombinant molecules were analyzed by Northern hybridization of total and mitochondrial RNA with ³²P-labelled oligonucleotide probes followed by PhosphorImager quantification (Typhoon-Trio, GE Healthcare).

The probes used: "D-loop" probe specific for recombinant molecules (see Fig. 1), (5'-GAG TCA TAC GCG CTA CCG ATT GCG CCA ACA AGG C-3'), hybridization temperature 50°C; cytosolic 5.8S rRNA probe, (5'-GGC CGC AAG TGC GTT CGA AG-3'), hybridization temperature 50°C; probe against the mitochondrial tRNA^{Val}, (5'-GAA CCT CTG ACT GTA AAG-3'), hybridization temperature 45°C.

To compare the stability of different recombinant RNA, the relative concentration of each RNA in various time periods after transfection was calculated as a ratio between the D-loop probe signal and the signal for cytosolic 5.8S rRNA. The relative amount of each imported RNA inside the mitochondria was estimated as a ratio between the signal obtained after hybridization with the D-loop probe and the signal with a probe against the mitochondrial tRNA^{Val} in the same RNA preparation. To compare import efficiencies of different RNA molecules, the total level of each RNA molecule in transfected cells was taken into account and normalized as described previously (22). At least three independent experiments were performed for each RNA.

Confocal microscopy – Cybrids cells cultivated in 2 cm² chambers slide (Lab-Tek) were transfected with Alexa Fluor 488-5-UTP labelled RNA. At different time periods after transfections, living cells were stained with TMRM (Tetramethylrhodamine Methyl Ester), 5 μM for 15 min at 37°C, washed and imaged in

DMEM without red phenol. The LSM 700 confocal microscope (Zeiss) was used in conjunction with Zen imaging software and images acquired with a Zeiss 63x /1,40 oil immersion objective with resolution 1024x1024. The excitation/ emission laser wavelengths were 488 nm (green channel) and 555 nm (red channel). Images were analysed using ImageJ (24) and JACoP plugin (25). Co-localization analysis were performed on multiple cells and optical sections. Pearson's correlation coefficient between two fluorophores was estimated (26,27) providing a measure of correlation between the intensities of each channel in each pixel. Its values range from -1 to +1, with a value of -1 indicating no significant correlation, while +1 indicates perfect correlation. In control experiments, cells were treated with Alexa Fluor 488-5 UTP in amounts corresponding to labelled RNA.

MtDNA heteroplasmy level analysis – To isolate total DNA from transfected cells, 1 cm² of cells were solubilized in 0.5 ml of buffer containing 10mM Tris-HCl, pH 7.5, 10mM NaCl, 25mM Na-EDTA and 1% SDS, then 10 μl of proteinase K solution (20 mg/ml) was added and the mixture incubated for 2 h at 50°C; 50 μl of 5M NaCl was added, the DNA was precipitated with isopropanol and used for PCR amplification. Heteroplasmy level was analyzed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) on a 125-bp PCR fragment encompassing nucleotides 13430 to 13555 of mtDNA obtained with primers CRC-F 5'-CAT ACC TCT CAC TTC AAC CTC C-3' and CRC-R 5'-AGG CGT TTG TGT ATG ATA TGT TTG C-3' (19). The A13514G mutation creates an HaeIII-specific cleavage site, giving two fragments of 80 and 45 bp. The HaeIII-digested fragments were separated on a 10% PAGE and stained with ethidium bromide. The proportion of mutant versus total mtDNA was calculated by densitometry using G-Box and GeneTools analysis software (Syngene) from the data of three independent experiments.

The digestion control was performed for each reaction. For this, a 600-bp PCR fragment encompassing nucleotides 1216 to 1813 of mtDNA obtained with primers CRS-F 5'-CGA TAA ACC CCG ATC AAC CTC-3' and CRS-R 5'-GGT TAT AAT TTT TCA TCT TTC CC-3' was cleaved by HaeIII to 350 and 250-bp fragments in the same tube as 125-bp PCR fragment containing the A13514G mutation site.

Mitochondria quantification – 2 cm² wells of 80% confluent cybrid cells and control wild type 143B cells, transfected with FD20H RNA, were stained with 5 μM TMRM and 200 nM MitoTracker[®] Green during 15 min in culture media. The intensity of fluorescence was directly measured in a culture plate in DMEM without red phenol by VICTOR[™] X3 multilabel plate reader (Perkin-Elmer) at 485 nm (green channel) and 555 nm (red channel), in triplicate for each sample. After fluorescence measurement, cells were detached and quantified by flow cytometry using CyFlow FACS and FloMax software (Partec). Activity of complex I was measured using a kit MitoSciences[®] (Abcam).

For Western blot immunodecoration, rabbit polyclonal antibodies (Abcam) were used: anti-VDAC1 (ab 15895) and anti-MT-ND5 (ab 83985). Antibodies against human MT-COX1 were kindly provided by A. Lombes (Inst. Cochin, Paris, France).

RESULTS

Design of anti-replicative RNA molecules – As it was reported previously, the helix-loop domains of FD RNA can serve as signals for RNA mitochondrial import, and this molecule can be used as a vector to deliver various sequences into the organelles (15). Recently, we also demonstrated that only one D-arm structure can be sufficient for mitochondrial targeting of recombinant molecule to mitochondria in living cells (28,29).

To apply the anti-genomic strategy to point mutations, we use as a model the A13514>G mutation inducing amino acid replacement D393>G in ND5 gene of human mtDNA, which encodes one of membrane domain subunits of the respiratory complex I (30). This mutation was initially found in two unrelated patients with MELAS-like syndrome (19). To target the mutant mitochondrial genome, a series of RNA molecules were constructed, bearing sequences complementary to a mutated region of ND5 gene inserted between two helix-loop domains of a short artificial FD RNA (Fig. 1).

Firstly, we analyzed the secondary structure predictions for FD RNA molecules bearing insertions of 16, 20 and 25 nucleotides corresponding to a fragment of ND5 gene, referred to as FD16L, FD16H, FD20L, FD20H, FD25L and FD25H; R for sequence of H-strand and S - for L-strand of mtDNA. For each sequence, a series of insertions bearing nucleotide G or C corresponding to the mutation

A13514>G (for either H or L strand) in various positions (Fig. 1) were analyzed by several softwares (see Materials and Methods) with similar results. Only molecules with a low probability of alternative folding were retained for further studies (Fig. 1). To check the ability of the selected versions for a specific annealing with mutated, but not wild type mtDNA, labelled recombinant RNAs were hybridized under physiological conditions with PCR-amplified mtDNA fragments either containing the mutation or not (Fig. 2). Versions FD25L and FD25H were not able to discriminate between mutant and wild type mtDNA; the shorter RNA molecule FD20H (but not FD20L) demonstrated specific annealing with the A13514G bearing mtDNA but not with wild type one. Annealing of molecules FD16H and FD16L was rather specific for mutant mtDNA; however, the efficiency of their hybridization at 37°C was reproducibly lower when compared to FD20H. We also tested chimeric molecules, containing a stem-loop RNA import determinant and DNA-inserts corresponding to FD20H and FD20L sequences, referred to as D20H-DNA and D20L-DNA (Fig. 2). Chimeric RNA-DNA molecule D20L-DNA demonstrated a higher ability to discriminate between mutant and wild type mtDNA when compared to FD20L. Thus, the recombinant molecules with 20 nucleotide insertions (FD20L, FD20H, D20L-DNA and D20H-DNA) have been selected for the further analysis.

Mitochondrial import of recombinant RNA – To study the localization of recombinant RNA molecules in cultured human cells, an approach was developed consisting in cell transfection with Alexa Fluor-488 labelled RNA FD20H and its subsequent co-localization with the mitochondrial network by means of fluorescent confocal microscopy (Fig. 3). RNA molecules (green fluorescence) have been detectable in cells in 24h after transfection (Day 1) as green dots, most probably being in RNA-Lipofectamine vesicles, without obvious co-localization with the mitochondria (red fluorescence). 3-4 days after transfection, the distribution of the green label drastically changed, the amount of dots was reduced, and RNA molecules were now mostly dispersed within the cell, displaying clear partial co-localization with the mitochondrial network. Pearson's correlation coefficient (26) increased

up to 0,7 for Day 4, indicating on mitochondrial targeting of FD20H RNA in living human cells. To measure the recombinant RNAs stability in cultured cells and the efficiency of their import into the mitochondrial matrix, cybrid cells were transfected with *in vitro* synthesised recombinant RNAs and chimeric molecules. Their degradation rate in transfected cells was evaluated by Northern hybridization of total cellular RNA at different time points spanning a 6-day period after transfection (Fig. 4A). Recombinant molecules were detectable in cybrid cells at least 6 days after transfection. The chimeric version D20L-DNA revealed to be more stable than FD20L and FD20H. Such result suggests that the "insertion" part, lacking strong secondary structures, gives a prominent impact on the degradation of recombinant molecules. Thus, recombinant molecules in which RNA insertions were replaced by DNA sequences demonstrated improved stability in the living cells.

Since the microscopy data can give only a rough indication on the mitochondrial import of RNA molecules, we performed Northern blot hybridization experiments. For this, cells were transfected with purified recombinant molecules. The mitochondrial import was analyzed by hybridization of the whole cell RNA and RNA isolated from purified and RNase treated mitoplasts (mitochondria where the outer membrane was removed by digitonin) as described previously (15,22,29). The absence of signal in the mitochondrial RNA after hybridization with the probe against the cytoplasmic 5.8S rRNA indicates that the treatment of mitochondria with ribonuclease and digitonin removed all contamination by cytoplasmic RNA (Fig. 4B). Hybridization signals obtained with the D-loop probe specific for all the recombinant molecules were normalized to the amounts of loaded mtRNA, estimated by hybridisation with a probe to a mitochondrial transcript (mt tRNA^{Val}). The data show that the import efficiencies of RNA molecules FD20H and FD20L were close to each other and to that of the chimeric molecule D20L-DNA.

Imported RNA can shift point mutation heteroplasmy level in cybrid cells – Transmitochondrial cybrid cell line containing patient's mitochondria with 35% of mtDNA molecules bearing A13514G mutation (referred thereafter as ND5 mutation) were transfected

with *in vitro* synthesised recombinant RNA and chimeric RNA-DNA molecules. Heteroplasmy levels (percentage of mutant ND5 mtDNA to all mtDNA molecules) were measured at different time points after transfection by RFLP analysis of PCR-amplified mtDNA fragment (Fig. 5 A,B). We observed a reproducible decrease of the proportion of mutant mtDNA in cells transfected by recombinant RNA containing FD20H inserts. The heteroplasmy shift became visible 3 days after transfection, then the heteroplasmy continued to decrease and reached the stable level of 15+/-5% in 6 days after transfection.

Remarkably, in cells transfected with FD20H RNA, the decrease of mutant mtDNA correlated to increased amount of mitochondria per cell measured as MitoTracker Green fluorescence (Fig. 5C). Moreover, the same increase of the fluorescence was detected by TMRM dye that is readily sequestered by active mitochondria, indicating on a fully energized state of mitochondrial membranes (31). To investigate if the partial correction of the heteroplasmy had an effect on the ND5 protein level, we compared the steady state amounts of ND5 in cybrid cells 4 and 5 days after transient transfection with the FD20H RNA by immunoblotting and observed a slight but very reproducible increase of the relative amount of ND5 in transfected cybrid cells (Fig. 6).

In parallel experiments, mock-transfected cybrid cells demonstrated no heteroplasmy shift (Fig. 5 A, B). Cell transfection with FD20L RNA led to a very small heteroplasmy decrease, reaching the level of 27+/-5% in 7 days. We do not consider this change as significant, taking into account the heteroplasmy variations in mock-transfected cells (Fig. 5A). Different effects of FD20H and FD20L RNA molecules are in perfect correlation with the more specific hybridization of FD20H RNA with mutant mtDNA (Fig. 2). Surprisingly, chimeric molecule D20L-DNA, characterized by a rather specific hybridization with mutant mtDNA *in vitro*, high stability in cells and efficient import into mitochondria, was not able to influence the heteroplasmy level.

Our data show that mitochondrially imported RNA (but not DNA) molecules can function as anti-genomic agents in human cells, affecting the amount of mitochondrial genomes bearing a point mutation.

DISCUSSION

Specific annealing of RNA to mtDNA bearing a point mutation – The anti-replicative approach aiming to shift heteroplasmy levels in mtDNA below the pathogenic threshold has been recently applied to cells containing a large 7 kb deletion in mtDNA (15). In this case, a new sequence generated at the fusion of the deletion boundaries has been inserted into RNA vector molecules, and specific annealing only with the mutant but not with wild type mtDNA was demonstrated for recombinant RNA molecules. In the present study, we investigated whether this strategy can be extended to point mutations in the mitochondrial genome. The first question we addressed was: could a recombinant RNA importable into human mitochondria anneal in a specific way with only the mutant mtDNA containing a point mutation, but not with wild type one?

Using Southern hybridization under conditions designed to approximate the intracellular ionic environment, we demonstrated that the sequence of 20 nucleotides corresponding to H-strand of mutated (A13514G) region of mtDNA (FD20H) can discriminate between fragments of mutant and wild type mtDNA. This was rather surprising, since the melting temperature predictions for hybrids between recombinant RNAs and mutated or wild type mtDNA (Table 1) show T_m values above 37°C. Given that, all RNA molecules tested are likely to anneal to mutant and wild type mtDNA fragments in the permissive conditions applied. According to the T_m predictions, we have started our experiments with shorter insertions of 8–10 nucleotides, which should anneal to mutant, but not to wild type mtDNA. Surprisingly, we were not able to detect any signal with these RNA molecules used as probes for Southern blot hybridization, and no effect on heteroplasmy level in transfected cells (not shown). Then, we gradually increased the length of the complementary part from 11 to 25 nt and obtained specific hybridization (Fig. 2) for molecules containing 16 and 20 nt insertions. We suppose that the discrepancy between predictions and experimental data is due to the absence of softwares adapted to calculate the T_m of RNA-DNA duplexes containing a mismatch. Another possible explanation consists in formation of alternative secondary structures in RNA molecules which can not be predicted by available softwares.

Another interesting issue: hybridization of RNA containing an insertion of the same length corresponding to the complementary L - strand of mtDNA (FD20L) was much less selective. This discrepancy can be explained by different base pairing: for FD20H, mismatch C*A decreases the T_m of hybridization with wild type mtDNA by 10°C (Table 1) comparing to mutant mtDNA (predicted by IDT Sci-Tools OligoAnalyser 3.1 software for mismatch containing hybrids). In contrast, for FD20L, a corresponding mismatch is G-T, which decreases T_m by only 5,5°C, allows annealing of FD20L RNA with both mtDNA fragments at 37°C. The above data show that a point mutation can be selectively addressed by RNA containing 20 nucleotide stretch, however, for transitions A->G (in L-strand of mtDNA), sequences corresponding to H-strand would have more selective effect and *vice versa*, for G->A transitions, only L-strand sequences should be used.

Pathogenic mutation in ND5 gene – mtDNA mutation A13514>G that we use as a model in present study, is localized in NADH dehydrogenase ND5 subunit of the respiratory complex I. This is the first and largest enzyme of the respiratory chain (45 subunits, total size are about 1 MDa), coupling electron transfer between NADH and ubiquinone to the translocation of four protons across the inner mitochondrial membrane (32). The L-shaped complex consists of hydrophilic and membrane domains. Three largest transmembrane subunits ND2, 4 and 5 at the far end of the membrane arm are homologous to each other and likely participate in the conformation-coupled proton translocation (33). Mutation A13514>G induces amino acid replacement D393>G localized in a very conserved region of ND5 transmembrane helix 12 (34,35), forming the second half of the proton channel, and involved in a cascade of conformational changes leading to proton translocation. Therefore, any mutation exchanging the negatively charged D393 to uncharged amino acid residue could disturb the transport of the proton through the ND5 subunit channel of respiratory complex I.

The ND5 gene turned out to be frequently mutated (30). Point mutation A13514>G inducing amino acid replacement D393>G has been detected in four unrelated patients with MELAS-like and Leigh syndromes (19,36,37). Another transition, the frequently

reported and well-documented G13513>A, affects the same D393 residue in the ND5 gene, but the amino acid replacement is different, D393>N (reviewed in (30)). A prominent clinical feature detected in patients with these mutations was a visual loss due to optic atrophy, indicating an exquisite sensitivity of the optic nerve to damage caused by alteration of the ND5 D393 residue (38). Thus, search for D393 mutations has been proposed to be a part of the routine screening for mitochondrial disorders (19).

More recently, among the patients with Leigh-like syndrome and D393>N mutation in ND5, several cases were reported characterized by normal complex I activity in muscle (36,39). The authors suggested that the relatively low mutant heteroplasmy and normal respiratory chain activities in muscle do not necessarily represent the situation in affected tissue such as brain and/or optic nerve. Thus, even low mutation load in D393 in the presence of normal respiratory chain analysis may be considered as pathogenic (36), illustrating the complexities of correlating A13514>G heteroplasmy levels with biochemical phenotype in patient's muscle and fibroblasts. This can be a characteristic feature of NADH dehydrogenase complex, since it was recently demonstrated that even a low dose of wild type ND6 gene is sufficient to drive assembly of near normal levels of complex I (6).

Effect of imported RNAs on mtDNA heteroplasmy – As we have shown previously, mitochondrially imported anti-replicative RNAs can cause a replication stalling at the site of RNA annealing to the mutant mtDNA due to impairing of the replication fork progression (15). Nevertheless, we obtained only a transient shift of heteroplasmy in cells bearing a large deletion in mtDNA, the initial heteroplasmy level being restored in 6-8 days after cell transfection with anti-replicative RNA. This can be explained by recombinant RNA degradation, followed by preferential replication of shorter mitochondrial genomes bearing deletion, due to the previously reported effect of "replicative advantage of deleted mtDNA" (40). In the present study, we successfully obtained a stable decrease of the proportion of mtDNA molecules containing ND5 point mutation after transfection of cybrid cells with anti-replicative RNA FD20H (Fig. 5). Since no difference was expected in the rate of replication for wild type and mutant mtDNA, we can suggest that even after

degradation of recombinant RNA, the induced shift in ND5 point mutation heteroplasmy level may become stable. The maintenance of wild type mtDNA enrichment was previously reported for several mutations (41,42).

Among several anti-replicative recombinant molecules, characterised by comparable stability in cells and mitochondrial import efficiency (Fig. 4), only one, FD20H, was able to induce a prominent heteroplasmy shift. This RNA molecule demonstrated the highest ability to discriminate between mutant and wild type mtDNA (Fig. 2). Chimeric molecule, containing the same sequence of the insertion part as FD20H, but in the form of DNA, was not capable to shift the heteroplasmy level (Fig. 5). These data provide an additional proof of recombinant RNA action at the level of mtDNA replication, since it was suggested that mitochondrial replisome helicase can separate DNA-DNA hybrids, but not regions of short RNA-DNA hybrids in the mtDNA D-loop (43). Thus, only mitochondrially imported RNA (but not DNA) molecules are likely to function as anti-replicative agents in human mitochondria.

Cybrid cells used in the present study, containing 35% of mtDNA molecules bearing the A13514>G mutation, were almost asymptomatic, characterized by a very slight decrease of all the measurable parameters as oxygen consumption, levels of ATP and ROS and complex I enzymatic activity compared to wild type 143B cell line (not shown). So far, we observed a prominent decrease of amount of mitochondria in cybrid cells, measured by use of MitoTracker Green, a mitochondria-selective fluorescent label, accumulating in the matrix (Fig. 5C) (44). Notably, transfection with anti-replicative RNA FD20H, leading to an important decrease of the level of ND5 point mutation, caused, at the same time, a recovery of mitochondrial content.

Despite the normal complex I enzymatic activity, we observed a significant decrease of the ND5 subunit in cybrid cells compared to wild type 143B cells (Fig. 6), which can be caused by instability of mutant protein or by low translation rate of mutant mRNA. Importantly, the shift of the heteroplasmy level induced by the anti-replicative RNA FD20H, caused also a partial rescue of the ND5 content, detected by the measurement of the steady state level of ND5 in transfected cells.

All our data indicate on the possibility to obtain a curative effect of mitochondrial

dysfunctions in human cells by a heteroplasmy shift induced by short RNA molecules targeted into mitochondria. Although the inhibitory effect was partial, it may have a long term therapeutic interest, since only high levels of mutations in human mtDNA become pathogenic. The validation of the anti-replicative RNA strategy

for a point mutation in mtDNA in cultured cybrid cells can be considered as an important step to further develop an efficient therapy of mitochondrial diseases.

REFERENCES

1. Burnett, J. C., and Rossi, J. J. (2012) *Chemistry & biology* **19**, 60-71
2. Ruiz-Pesini, E., Lott, M. T., Procaccio, V., Poole, J. C., Brandon, M. C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., and Wallace, D. C. (2007) *Nucleic Acids Res* **35**, D823-828
3. Wallace, D. C. (2010) *Environmental and molecular mutagenesis* **51**, 440-450
4. Rustin, P., H, T. J., Dietrich, A., R, N. L., Tarassov, I., and Corral-Debrinski, M. (2007) *Med Sci (Paris)* **23**, 519-525
5. Manfredi, G., Fu, J., Ojaimi, J., Sadlock, J. E., Kwong, J. Q., Guy, J., and Schon, E. A. (2002) *Nat Genet* **30**, 394-399
6. Perales-Clemente, E., Fernandez-Silva, P., Acin-Perez, R., Perez-Martos, A., and Enriquez, J. A. (2011) *Nucleic Acids Res* **39**, 225-234
7. Schneider, A. (2011) *Annu Rev Biochem* **80**, 1033-1053
8. Karicheva, O. Z., Kolesnikova, O. A., Schirtz, T., Vysokikh, M. Y., Mager-Heckel, A. M., Lombes, A., Boucheham, A., Krasheninnikov, I. A., Martin, R. P., Entelis, N., and Tarassov, I. (2011) *Nucleic Acids Res* **39**, 8173-8186
9. Kolesnikova, O. A., Entelis, N. S., Jacquin-Becker, C., Goltzene, F., Chrzanoska-Lightowers, Z. M., Lightowers, R. N., Martin, R. P., and Tarassov, I. (2004) *Hum Mol Genet* **13**, 2519-2534
10. Bacman, S. R., Williams, S. L., Garcia, S., and Moraes, C. T. (2010) *Gene Ther* **17**, 713-720
11. Bacman, S. R., Williams, S. L., Hernandez, D., and Moraes, C. T. (2007) *Gene Ther* **14**, 1309-1318
12. Taylor, R. W., Chinnery, P. F., Turnbull, D. M., and Lightowers, R. N. (1997) *Nat Genet* **15**, 212-215
13. Muratovska, A., Lightowers, R. N., Taylor, R. W., Turnbull, D. M., Smith, R. A., Wilce, J. A., Martin, S. W., and Murphy, M. P. (2001) *Nucleic Acids Res* **29**, 1852-1863.
14. Kolesnikova, O., Kazakova, H., Comte, C., Steinberg, S., Kamenski, P., Martin, R. P., Tarassov, I., and Entelis, N. (2010) *RNA* **16**, 926-941
15. Comte, C., Tonin, Y., Heckel-Mager, A. M., Boucheham, A., Smirnov, A., Aure, K., Lombes, A., Martin, R. P., Entelis, N., and Tarassov, I. (2013) *Nucleic Acids Res* **41**, 418-433
16. Zuker, M. (2003) *Nucleic Acids Res* **31**, 3406-3415
17. Sugimoto, N., Nakano, S., Katoh, M., Matsumura, A., Nakamuta, H., Ohmichi, T., Yoneyama, M., and Sasaki, M. (1995) *Biochemistry* **34**, 11211-11216
18. Bellon, L. (2001) *Curr Protoc Nucleic Acid Chem* **Chapter 3**, Unit 3 6
19. Corona, P., Antozzi, C., Carrara, F., D'Incerti, L., Lamantea, E., Tiranti, V., and Zeviani, M. (2001) *Ann Neurol* **49**, 106-110
20. Smirnov, A. V., Entelis, N. S., Krasheninnikov, I. A., Martin, R., and Tarassov, I. A. (2008) *Biochemistry (Mosc)* **73**, 1418-1437

21. Kohrer, C., Xie, L., Kellerer, S., Varshney, U., and RajBhandary, U. L. (2001) *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**, 14310-14315
22. Smirnov, A., Tarassov, I., Mager-Heckel, A. M., Letzelter, M., Martin, R. P., Krasheninnikov, I. A., and Entelis, N. (2008) *RNA* **14**, 749-759
23. Mager-Heckel, A. M., Entelis, N., Brandina, I., Kamenski, P., Krasheninnikov, I. A., Martin, R. P., and Tarassov, I. (2007) *Methods Mol Biol* **372**, 235-253
24. Schneider, C. A., Rasband, W. S., and Eliceiri, K. W. (2012) *Nat Methods* **9**, 671-675
25. Bolte, S., and Cordelieres, F. P. (2006) *J Microsc* **224**, 213-232
26. Zinchuk, V., Zinchuk, O., and Okada, T. (2007) *Acta Histochem Cytochem* **40**, 101-111
27. Zinchuk, V., and Grossenbacher-Zinchuk, O. (2009) *Prog Histochem Cytochem* **44**, 125-172
28. Gowher, A., Smirnov, A., Tarassov, I., and Entelis, N. (2013) *PLoS One* **8**, e66228
29. Tonin, Y., Heckel, A. M., Dovydenko, I., Meschaninova, M., Comte, C., Venyaminova, A., Pyshnyi, D., Tarassov, I., and Entelis, N. (2013) *Biochimie*
30. Blok, M. J., Spruijt, L., de Coo, I. F., Schoonderwoerd, K., Hendrickx, A., and Smeets, H. J. (2007) *J Med Genet* **44**, e74
31. Davidson, S. M., Yellon, D., and Duchon, M. R. (2007) *Methods Mol Biol* **372**, 421-430
32. Efremov, R. G., and Sazanov, L. A. (2012) *Biochim Biophys Acta* **1817**, 1785-1795
33. Ohnishi, T., Ohnishi, S. T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., and Weber, R. T. (2012) *Biochim Biophys Acta* **1817**, 1803-1809
34. Baradaran, R., Berrisford, J. M., Minhas, G. S., and Sazanov, L. A. (2013) *Nature* **494**, 443-448
35. Efremov, R. G., and Sazanov, L. A. (2011) *Nature* **476**, 414-420
36. Brautbar, A., Wang, J., Abdenur, J. E., Chang, R. C., Thomas, J. A., Grebe, T. A., Lim, C., Weng, S. W., Graham, B. H., and Wong, L. J. (2008) *Molecular genetics and metabolism* **94**, 485-490
37. Bugiani, M., Invernizzi, F., Alberio, S., Briem, E., Lamantea, E., Carrara, F., Moroni, I., Farina, L., Spada, M., Donati, M. A., Uziel, G., and Zeviani, M. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1659**, 136-147
38. Chol, M., Lebon, S., Benit, P., Chretien, D., de Lonlay, P., Goldenberg, A., Odent, S., Hertz-Pannier, L., Vincent-Delorme, C., Cormier-Daire, V., Rustin, P., Rotig, A., and Munnich, A. (2003) *J Med Genet* **40**, 188-191
39. Sudo, A., Honzawa, S., Nonaka, I., and Goto, Y. (2004) *J Hum Genet* **49**, 92-96
40. Diaz, F., Bayona-Bafaluy, M. P., Rana, M., Mora, M., Hao, H., and Moraes, C. T. (2002) *Nucleic Acids Res* **30**, 4626-4633
41. Bayona-Bafaluy, M. P., Blits, B., Battersby, B. J., Shoubridge, E. A., and Moraes, C. T. (2005) *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 14392-14397
42. Suen, D. F., Narendra, D. P., Tanaka, A., Manfredi, G., and Youle, R. J. (2010) *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 11835-11840
43. Bowmaker, M., Yang, M. Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H. T., Huberman, J. A., and Holt, I. J. (2003) *J Biol Chem* **278**, 50961-50969
44. Presley, A. D., Fuller, K. M., and Arriaga, E. A. (2003) *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* **793**, 141-150

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Massimo Zeviani (National Neurological Institute 'Carlo Besta' of Milan) for providing the *trans*-mitochondrial cybrid cell lines and to Jérôme Mutterer (IBMP, Strasbourg) for helpful assistance in confocal microscopy analysis. We also thank Virginie Girault, Catherine Murfitt and Laure Poirier for their experimental contribution.

FOOTNOTES

This work was supported by CNRS (Centre National de Recherche Scientifique); University of Strasbourg; AFM (Association Française contre les Myopathies); ANR (Agence Nationale de la Recherche); FRM (Fondation pour la Recherche Médicale); ARCUS/Suprachem collaboration program; LIA collaboration program (ARNmitocure) and Labex MitoCross (National Program "Investissement d'Avenir"). Yann Tonin was supported by FRM and AFM PhD fellowships. Funding for open access charge: Institutional budget (Strasbourg University & CNRS).

¹To whom correspondence should be addressed : UMR 7156 Université de Strasbourg-CNRS, 21 Rue René Descartes, 67084, Strasbourg, France; Tel (+33) 3 68 85 14 81; Fax (+33) 3 68 85 13 65; E-mail : n.entelis@unistra.fr

^o present address: Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, Russia

² Laboratory of RNA Chemistry, Institute of Chemical Biology and Fundamental Medicine SB RAS, Novosibirsk Russia

The authors declare no conflict of interest.

FIGURE LEGENDS

FIGURE 1. Design of anti-replicative RNAs targeting A13514>G mutation in human mtDNA. Human mtDNA genetic map and sequence of the mutated region of ND5 gene are presented, A13514>G mutation shown in bold; FD-RNA stem-loop import determinants are in gray. Design of recombinant RNA FD20H containing 20-mer corresponding to the H-strand of mtDNA is shown, see text for details.

FIGURE 2. Ability of recombinant molecules to discriminate wild type and mutant mtDNA. (A) Predicted secondary structures of anti-replicative molecules. Stem-loop import determinants are shown in gray. D20H-DNA and D20L-DNA, chemically synthesized chimeric molecules, RNA insertion has been replaced by DNA one. **(B)** Southern hybridization of wild type (WT) or mutant (A13514G) mtDNA fragments with labelled recombinant RNAs (indicated at the left) under physiological conditions. **(C)** Graphical representation of hybridization specificity of different recombinant molecules (indicated below the graphs). The hybridization specificity was calculated for each RNA as $1 - (\text{ratio between hybridization signals for wild type and mutated DNA fragments})$. Thus, for recombinant RNA annealed only to mutant DNA fragment, the hybridization specificity value reached 1, and for RNA annealed equally to mutant and wild type fragments, this value was close to 0. \pm SD calculated from 3 independent experiments.

FIGURE 3. Confocal microscopy of human cells transfected with fluorescently labelled RNA. (A) Confocal microscopy of 143B cells transfected with Alexa-Fluor 488 labelled FD20H RNA (green) at various time periods after transfection (as indicated above the panels). Control, cells mock-transfected with Alexa Fluor 488-5 UTP. TMRM, visualization of mitochondrial network by red staining. **(B)** Quantification of RNA co-localization with mitochondria. Pearson's correlation coefficients were estimated for multiple cells and 6-10 optical sections in two independent experiments. Its values normally range from -1 to +1, with a value of -1 indicating no significant correlation, while +1 indicates perfect correlation.

FIGURE 4. Anti-replicative RNA stability and mitochondrial import in transiently transfected cybrid cells. (A) On the left, an example of Northern hybridization of total RNA isolated in 3-6 days after cell transfection (as indicated below) with various recombinant molecules (indicated above the panels). Probes used for hybridization: D-loop, specific for all recombinant molecules used for transfection; 5S, against 5S rRNA to quantify the level of recombinant RNA in the cells. On the right, time-dependence of RNA decay, \pm SD calculated from at least 4 independent experiments. (B) Mitochondrial import of recombinant molecules in transiently transfected cybrid cells. Northern hybridizations of RNA extracted from cells (Total RNA) or purified mitoplasts (Mito RNA) 48h after transfection. Above, RNAs used for transfection are indicated. On the left, hybridization probes: D-loop, specific for recombinant molecules used for the transfection; Cytoplasmic 5.8S, against 5.8S rRNA to check the absence of cytosolic RNA in mitochondrial samples; Mitochondrial tRNA^{Val}, to normalize the level of recombinant RNA to amount of loaded material.

FIGURE 5. The effect of recombinant RNA on heteroplasmy level in transfected cybrid cells. (A) Time dependence of A13514G mutation heteroplasmy level followed during 7 days after transfection of cybrid cells with different recombinant molecules. Mut, mock-transfected cybrid A13514G cells; Wild type, mock-transfected 143B cells; Mut+FD20L, FD20H or D20L-DNA, cybrid cells transfected with corresponding recombinant molecule. (B) An example of RFLP analysis for DNA samples isolated in 3-7 days (as indicated above) after cybrid cells transfection with recombinant molecules indicated at the right. Heteroplasmy levels (%) are indicated below the panels. Digestion control was performed for each reaction, as shown at the left panel. For this, 600-bp PCR fragment of mtDNA was cleaved by HaeIII to 350 and 250-bp fragments in the same tube as 125-bp PCR fragment spanning A13514G mutation site. Size of fragments is indicated at the left of each panel. (C) Evaluation of total and energised mitochondria content in 143B (Wild-type) and cybrid cells (A13514G) transfected with RNA FD20H during 8 days after cell transfection. MitoTracker Green (upper panel) and TMRM (lower panel) fluorescence normalized to the number of cells, values of wild type cells were taken as 1.

FIGURE 6. The effect of FD20H RNA on the level of mitochondrial proteins in transfected cybrid cells. (A) Steady-state level of mitochondrial proteins in transfected cells. Total cellular proteins were immunodecorated with anti-VDAC1 (porin, nuclear DNA encoded protein of outer mitochondrial membrane), anti-MT-COX1 or anti-MT-ND5 antibodies as indicated. WT, parental 143B cell line; CY, A13514G cybrid cell line; D0, D4, D5, days after cells transfection with FD20H RNA. (B) Diagram showing the ratio of signals detected for mitochondrial proteins, at 0, 4 and 5 days after transfection with FD20H RNA. C/P, COX1 protein amount normalized to porin as a control, N/P, ND5 protein amount normalized to porin. The values at D0 for the wild type cell line was taken as 1. The error bars correspond to 3 independent experiments.

Table 1. Melting temperature predictions for hybrids between recombinant RNAs and mutated or wild type (WT) mtDNA regions.

RNA	Insert (bp)	T _m for mutated DNA	T _m for WT DNA*	Δ T _m
FD16L	16	48.4°C	40.2°C	8.2°C
FD16H	16	48.4°C	35.0°C	13.4°C
FD20L	20	54.9°C	49.3°C	5.6°C
FD20H	20	52.8°C	42.9°C	9.9°C
FD25L	25	59.0°C	54.9°C	4.1°C
FD25H	25	59.0°C	52.2°C	6.8°C

* predicted by IDT Sci-Tools OligoAnalyser 3.1 software for mismatch containing DNA-DNA hybrids. Δ T_m, predicted decrease of T_m for wild type mtDNA comparing to mutated mtDNA.

FIGURE 2

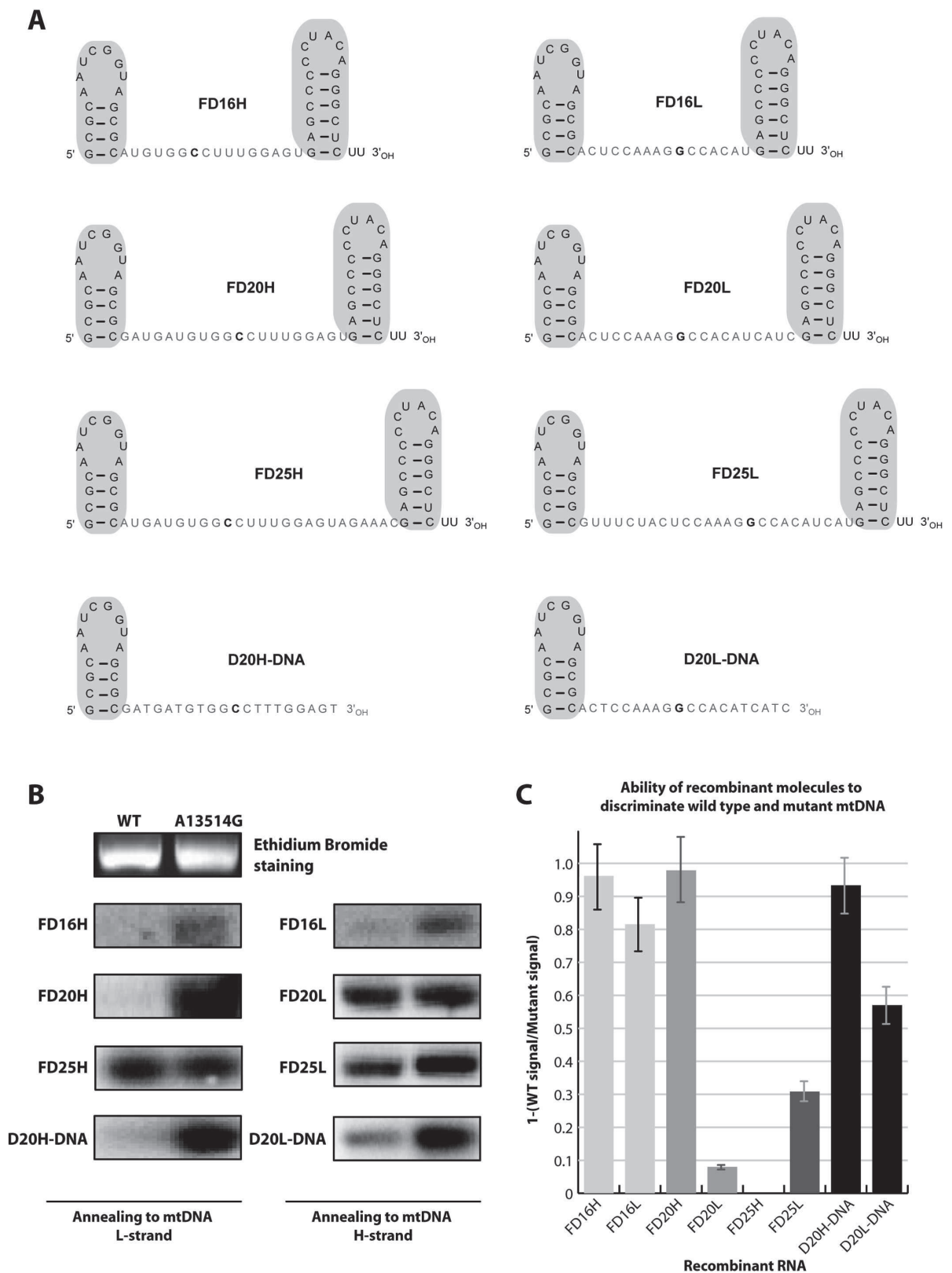


FIGURE 3

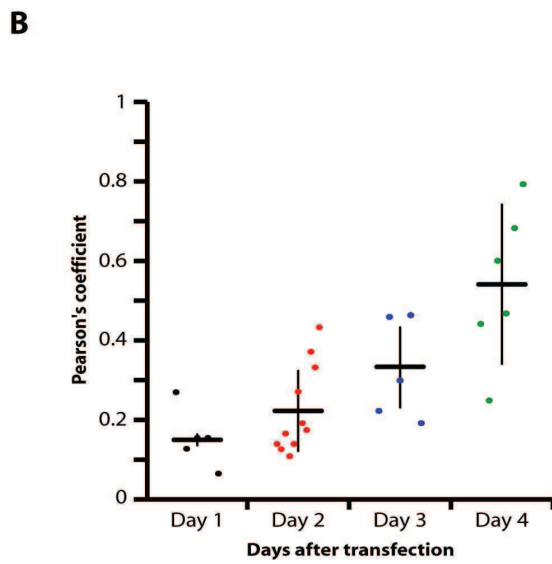
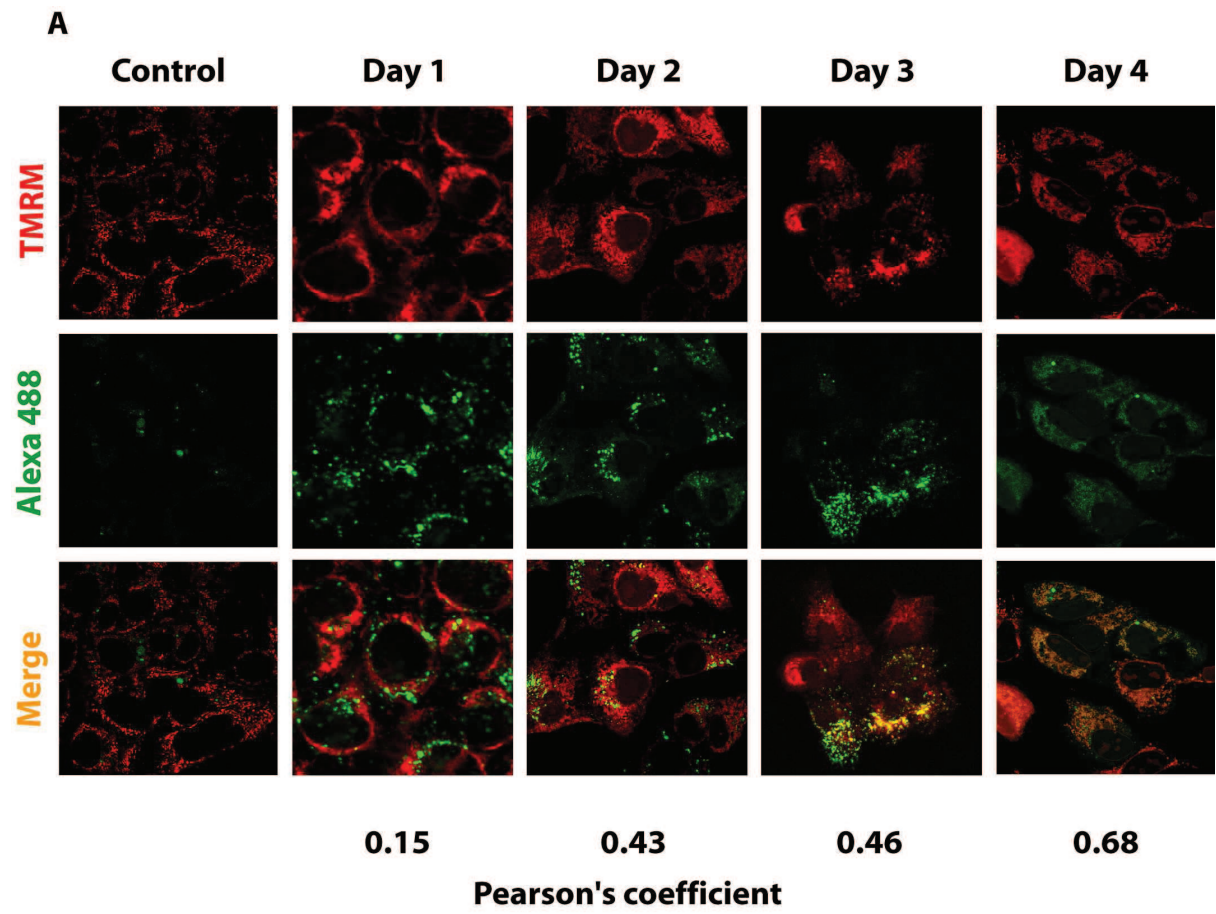
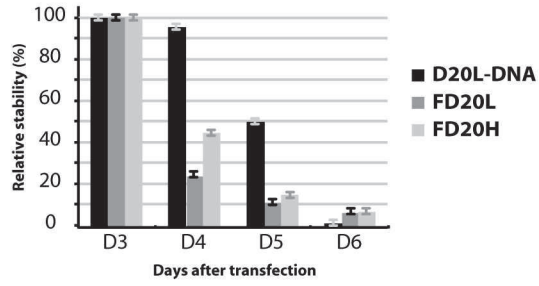
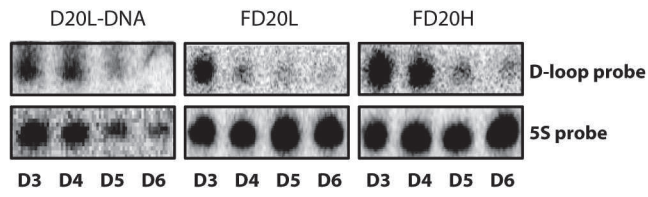


FIGURE 4

A



B

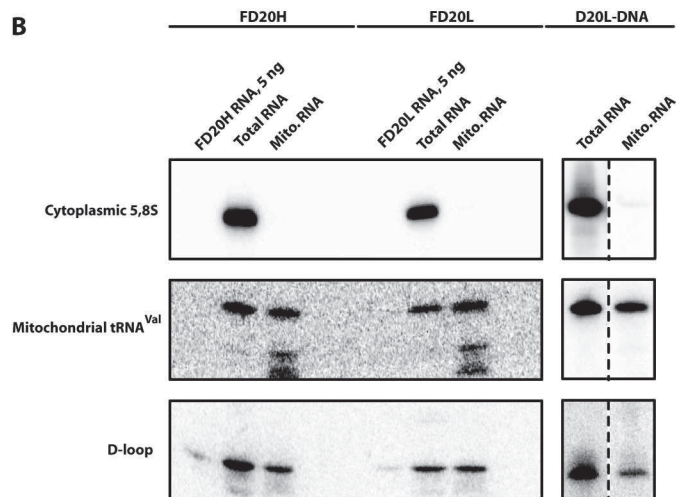


FIGURE 5

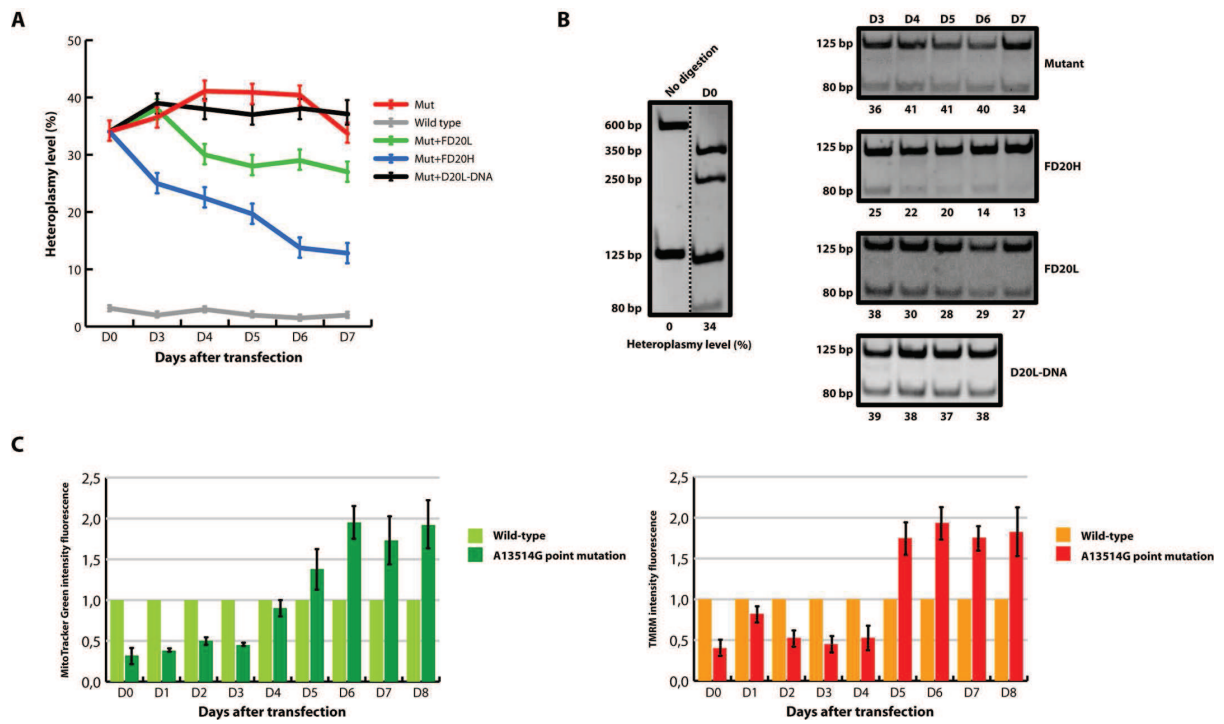
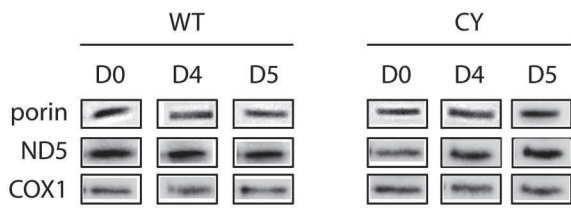
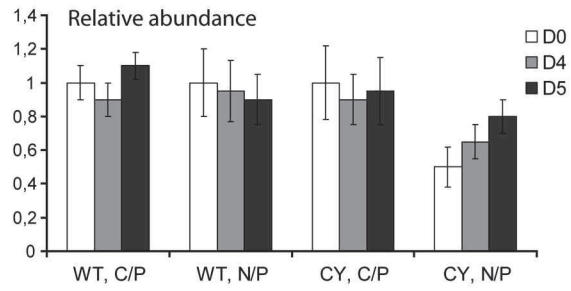


FIGURE 6

A



B



IV. Etude des aspects phénotypiques associés à une diminution de l'hétéroplasmie

Pour confirmer l'induction d'une baisse d'hétéroplasmie par nos ARN anti-génomique, il serait intéressant de pouvoir observer la variation d'un paramètre phénotypique mesurable associé à la mutation considérée. Ce chapitre a pour vocation de proposer certaines pistes qui pourraient être exploitées dans ce sens. Néanmoins, les observations qui y sont présentées, font office de résultats préliminaires et méritent d'être étudiées plus en détails pour confirmer les tendances observées.

1. Mesure du niveau de respiration cellulaire

La première de ces pistes consiste à évaluer la fonction principale des mitochondries, à savoir la respiration. Dans le cas présent nous allons nous intéresser à la mutation du gène ND5 A13514G. Le niveau de consommation d'oxygène a donc été comparé entre des cellules 143B, nous servant de contrôle positif, et des cellules cybrides mutantes. Les détails techniques de ce test effectué en collaboration avec le Dr Mikhail Vysokikh sont expliqués dans la **partie II-3.6 de Matériel et Méthodes**.

En 2 mots, des quantités équivalentes de cellules (environ 1.10^6 cellules par test) ont été traitées à la digitonine pour induire la perméabilité de leur membrane, puis mises en présence de différents substrats stimulant ou inhibant l'activité des complexes respiratoires. Pour amorcer la réaction, nous utilisons du glucose qui permet d'induire le transfert d'électrons au niveau de la chaîne respiratoire, du NADH vers l'oxygène via le complexe I. La vitesse maximale de consommation d'oxygène est ensuite mesurée en présence de fccp et d'oligomycine. L'addition de ces composés nous permet d'évaluer la capacité des cellules à réguler leur activité respiratoire en réponse à une diminution du gradient de protons, condition amenant à une augmentation du taux de synthèse d'ATP par l'ATP synthase. L'utilisation de succinate permet quant à lui de court-circuiter le complexe I et de réduire le cytochrome c, les électrons étant alors directement transférés au complexe II puis IV. Ceci permet donc de s'affranchir du complexe I et du cytochrome c et de mettre en évidence leur impact sur le niveau de respiration.

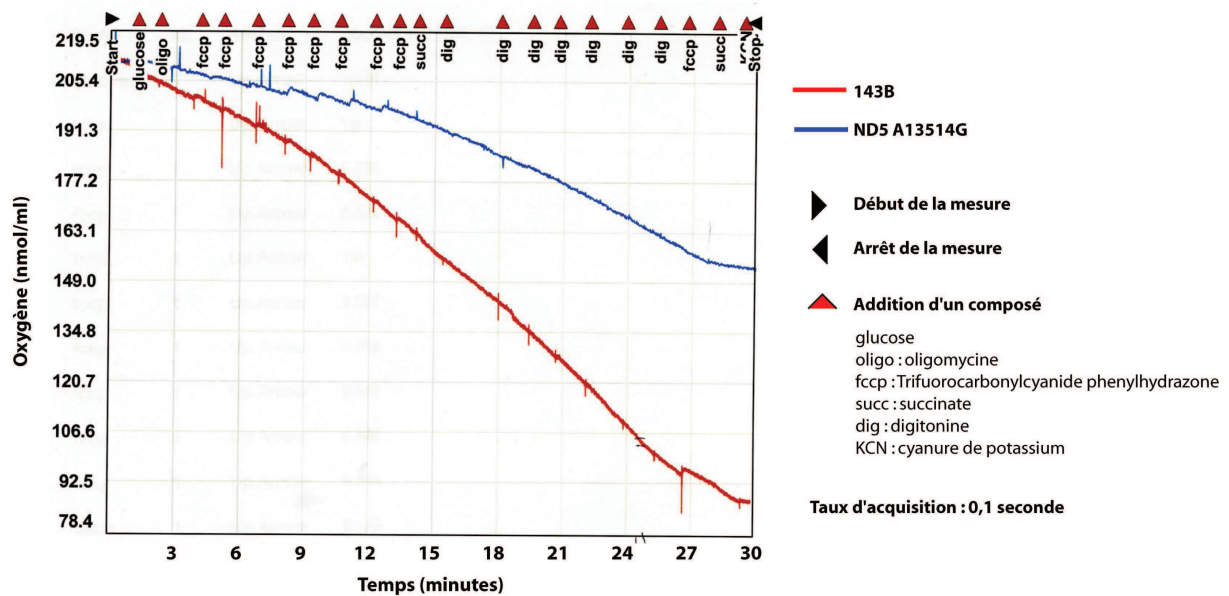


Figure 56 : Mesure de la consommation d'oxygène des cellules ND5

La consommation d'oxygène des cellules ND5 sauvage (rouge) et mutante (bleu) est mesurée. Le niveau d'oxygène est indiqué en nmol/ml. La mesure est effectuée sur une période de 30 minutes durant laquelle différents composés dont la nature est indiquée à droite sont ajoutés en cours de mesure.

La vitesse maximale de consommation d'oxygène est mesurée en différents points de la courbe suite à l'addition successive des composés. En comparant les résultats obtenus pour les 2 types cellulaires (**Figure 56**), nous constatons une différence de près de 50% entre les cellules sauvages et les cellules mutantes dont le taux d'hétéroplasmie a été préalablement établi à 50%. Un lien de proportionnalité semblant relier ces 2 paramètres, il est alors tout à fait envisageable d'utiliser ce type de mesure pour estimer l'effet de nos ARN d'un point de vue phénotypique. Nous pourrions ainsi mettre en relation une diminution du taux d'hétéroplasmie et un recouvrement proportionnel de l'activité respiratoire, à condition bien entendu qu'une telle proportionnalité entre hétéroplasmie et activité respiratoire soit conservée. Mais une telle différence n'est pas toujours constatable ni en adéquation avec le type de mutation ou son niveau d'hétéroplasmie. Pour preuve, si l'on considère la délétion associée au syndrome KSS, les cellules cybrides utilisées ne présentent un déficit respiratoire que de 10% alors que plus d'un tiers du génome est manquant et que le taux d'hétéroplasmie est supérieur (65%). Dans ce dernier cas, l'utilisation d'une telle méthode serait inadaptée.

2. Mesure de l'activité des complexes respiratoires

Mis à part la mesure du niveau de respiration cellulaire, il est également possible d'estimer le niveau d'activité enzymatique des complexes respiratoires. Dans le cas de la mutation ND5, nous avons déterminé l'activité du complexe qui lui est associé, à savoir le complexe I. Pour cela, nous mesurons le niveau d'oxydation du NADH en NAD^+ d'une manière indirecte à l'aide d'un kit développé pour ce type d'analyse. Après extraction, l'échantillon cellulaire à analyser est réparti dans des puits recouverts d'anticorps spécifiques du complexe I. Une fois le complexe capturé par les anticorps, le substrat est ajouté et l'activité enzymatique mesurée via de la variation de l'absorbance. En effet, lorsqu'il est actif, le complexe I va procéder à l'oxydation du NADH en NAD^+ et libérer un hydrogène qui va alors réduire un substrat secondaire. L'accumulation de ce substrat coloré va induire une augmentation de l'absorbance et ce de manière proportionnelle au niveau d'activité du complexe. Grâce à cette réaction, on peut ainsi mesurer la vitesse réactionnelle pour différentes lignées cellulaires et déterminer le taux d'activité du complexe I.

Pour cette étude, 3 lignées ont été analysées. Une lignée sauvage nous servant de contrôle positif ainsi que 2 lignées mutantes présentant des taux d'hétéroplasmie distincts. De la sorte, nous souhaitons voir si le déficit respiratoire préalablement observé au sein des cellules mutantes pouvait être relié à une diminution d'activité spécifique du complexe I. Par la même, nous souhaitons également déterminer si le niveau d'activité du complexe était proportionnel au taux d'hétéroplasmie (**Figure 57**).

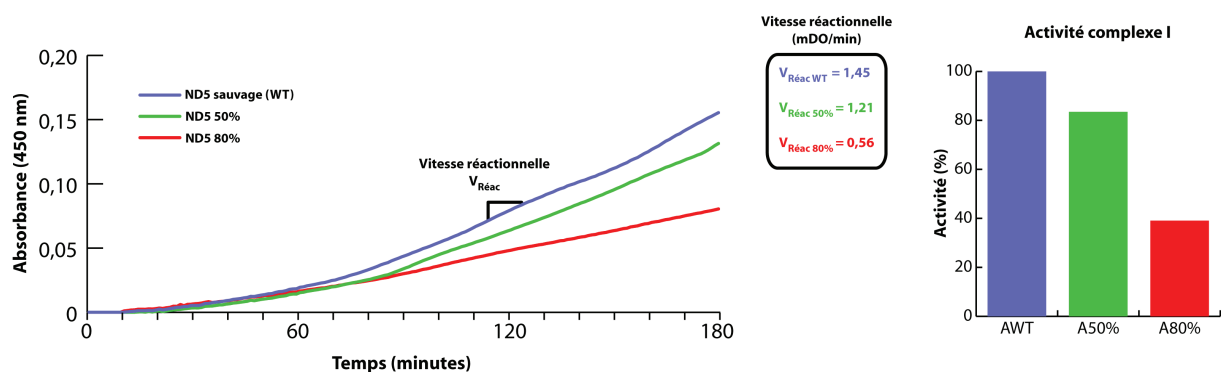


Figure 57 : Mesure de l'activité du complexe I

L'augmentation de l'absorbance à 450 nm est mesurée toutes les minutes pendant 3h. La vitesse réactionnelle (en mDO/min) est calculée pour des cellules sauvages (bleu), mutantes avec un taux d'hétéroplasmie de 50% (vert) et 80% (rouge). Grâce à cette vitesse réactionnelle on peut en déduire pour chaque lignée cellulaire, le niveau d'activité du complexe I.

La mesure de l'absorbance à 450 nm a été effectuée de manière automatisée à l'aide d'un lecteur de plaques, une mesure est ainsi prise toutes les minutes et ce pendant 3h. Lors de la première heure, nous ne constatons aucune différence notable entre les différentes lignées, mais une fois ce délai passé nous entamons alors une phase d'activité exponentielle. Durant cette phase, une déviation progressive de chacune des courbes est observable, la vitesse réactionnelle étant plus élevée pour les cellules sauvages que pour les 2 lignées mutantes. Du point de vue de l'activité du complexe I, cette variation se traduit par une différence d'environ 20% entre les cellules sauvages et la lignée arborant un taux d'hétéroplasmie de 50%. Hormis cette différence, on note une diminution encore plus prononcée lorsque le taux d'hétéroplasmie atteint 80%, l'activité enzymatique étant alors diminuée de 60%. Bien qu'une forte corrélation entre le taux d'hétéroplasmie et le niveau d'activité du complexe I ait été établi lors de la caractérisation de cette mutation ([Corona et al., 2001](#)), cette analyse a montré qu'elle pouvait constituer un test intéressant pour établir un lien entre génotype et phénotype. En revanche, de faibles variations du taux d'hétéroplasmie ne seront pas discernables du point de vue de l'activité du complexe.

3. Organisation du réseau mitochondrial et niveau d'énergisation des mitochondries

Deuxième point susceptible de constituer un marqueur phénotypique : le réseau mitochondrial. Comme nous avons pu le dire précédemment, les mitochondries s'organisent en un large réseau dynamique se déployant dans toute la cellule et capable de s'adapter en réponse aux conditions environnementales. Cette plasticité est mue par des mécanismes de fission/fusion permanents faisant varier leur nombre ainsi que leur morphologie. En partant de ce principe, il semblerait logique de penser que lorsque les cellules sont affectées par un trouble respiratoire, elles doivent adapter leur organisation pour compenser ce déficit. Inversement, durant les dernières années de nombreuses études ont montré que des changements dans la structuration du réseau mitochondrial avaient une influence indéniable sur les fonctions cellulaires. Que ce soit au niveau de la signalisation cellulaire, de la production de ROS, de la plasticité neuronale ou de l'atrophie musculaire, la compartimentalisation des mitochondries et leur localisation spatiale jouent un rôle déterminant dans la mise en oeuvre des processus bioénergétiques ([Campello and Scorrano, 2010](#)). Mais si le lien entre structure et bioénergétique semble établi, les mécanismes qui

régissent cette relation de cause à effet dans le cas de maladies sont toujours à établir. Dans le cas qui nous occupe, nous souhaiterions donc déterminer si l'apparition de la mutation dans le gène *MT-ND5* peut être associée à une réorganisation notable du réseau mitochondrial. Pour ce faire, nous avons observé l'organisation de ce réseau chez des cellules saines et mutées par microscopie confocale. Le réseau mitochondrial est marqué à l'aide de TMRM et permet ainsi mettre en évidence les mitochondries actives. Nous constatons lors de l'observation, que les différentes lignées semblent afficher une organisation du réseau mitochondrial nettement distincte lorsqu'elles sont affectées ou non par la mutation. En effet, alors que les mitochondries des cellules sauvages semblent s'organiser en un réseau plutôt réticulé, celui-ci adopte une structure beaucoup plus ponctuée dans les lignées mutantes (**Figure 58**).

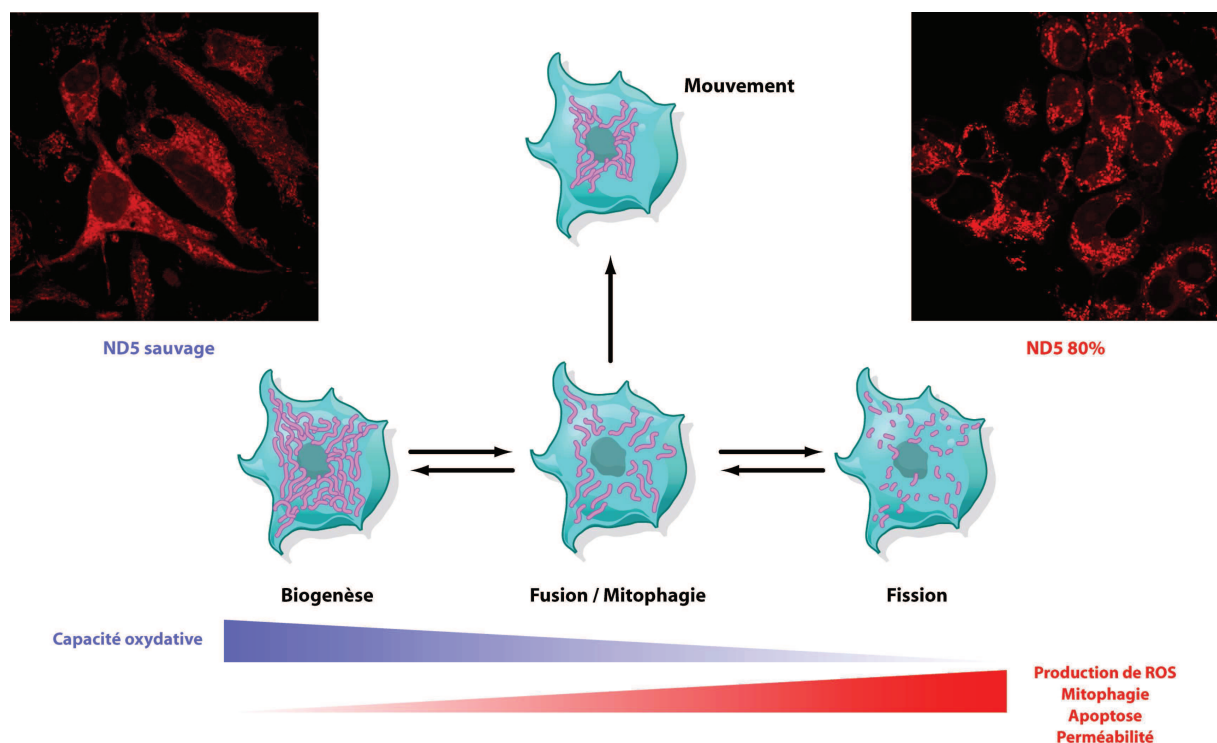


Figure 58 : Organisation du réseau mitochondrial et microscopie confocale

Le réseau mitochondrial (en rose) est dynamique et s'organise de manière distincte en fonction des processus cellulaires : mouvement, biogenèse, fusion, mitophagie ou fission. Cette dynamique s'accompagne de la variation de certains paramètres dont l'augmentation est délétère (rouge) ou non (bleu). Modifié de (Vafai and Mootha, 2012). De part et d'autre de ce schéma, le réseau mitochondrial de cellules ND5 sauvages ou mutantes (80% d'hétéroplasmie). Les mitochondries ont été marquées au TMRM et observées par microscopie confocale (grossissement 63x).

Cette ponctuation traduit un phénomène de fission associé à une augmentation de la perméabilité mitochondriale ou de la production de ROS mais également une diminution des

capacités respiratoires des mitochondries (Picard et al., 2013). Sur le papier nos observations semblent être en accord avec cette idée mais les choses ne sont pas si simples qu'elles peuvent le paraître. En effet, selon les études l'aspect adopté par des mitochondries atteintes de troubles respiratoires n'est pas le même et ne fait donc pas l'unanimité. Autre problème, il est nécessaire de pouvoir quantifier le niveau de connexion du réseau mitochondrial pour déterminer si celui-ci varie avec le niveau d'hétéroplasmie. Ce type d'analyses nécessite la mise en œuvre de modélisations mathématiques pour mettre en évidence les interactions gouvernant la structuration du réseau mitochondrial lors des mécanismes de fusion/fission (Sukhorukov et al., 2012).

Actuellement, nous essayons de réaliser au laboratoire la quantification de ce niveau de connexion via des méthodes comparables, mais ce travail en cours de réalisation nécessite l'acquisition d'un grand nombre d'images pour obtenir un échantillonnage statistique significatif. A terme, ce travail pourrait nous permettre de confirmer ou non cette tendance et de pouvoir la mesurer. Grâce à l'aide du Dr Jérôme Mutterer, nous avons donc amorcé la mise au point de la méthode d'analyse de ces images. En 2 mots, ce système se base sur l'acquisition d'une pile d'images par microscopie confocale, puis à l'utilisation de programmes informatiques dédiés à l'analyse tridimensionnelle. Par ce biais, le volume du réseau mitochondrial d'une cellule pourra alors être reconstruit et la connexion des objets (autrement dit des mitochondries) estimée selon le volume qu'ils occupent au sein du réseau. Les programmes informatiques nécessaires à cette analyse sont présentés dans la **partie I-3 de Matériel et Méthodes**. En revanche, de par les moyens qu'elle nécessite, cette étude doit être considérée comme une solution alternative plutôt qu'une analyse de routine. Mais avant d'y parvenir de nombreux tests méritent encore d'être effectués pour évaluer la reproductibilité et la pertinence de cette méthode.

En parallèle de cette étude morphologique, une étude plus fonctionnelle du réseau mitochondrial est possible. En effet, comme présenté dans l'**Article n°4**, il est tout à fait envisageable d'analyser le contenu mitochondrial de la cellule et d'en déterminer son niveau d'énergisation. Ainsi comme présenté dans ledit article, nous pouvons voir que les cellules mutées semblent posséder un contenu mitochondrial (mitochondries totales et énergisées) plus important que les cellules sauvages. Une hypothèse serait alors que le

déficit d'activité respiratoire des cellules mutantes pourrait être compensé par l'augmentation du volume des mitochondries.

4. Détermination des sites d'arrêt de la réplication par LM-PCR

Lors du premier chapitre de cette partie Résultats & Discussion, nous avons abordé la méthode d'électrophorèse bidimensionnelle d'ADNmt. Pour localiser encore plus précisément, et ce au nucléotide près, les sites de pause lors de la réplication de l'ADNmt, cette technique pourrait être complétée par une analyse par LM-PCR (ou Ligation-Mediated Polymérase Chain Reaction). Initialement développée pour l'étude d'empreintes protéiques (ou footprinting) sur l'ADN dans les cellules vivantes (Mueller and Wold, 1989), cette technique de séquençage génomique permet en fait la cartographie des cassures monocaténares au sein de l'ADN. Depuis son développement, la technologie de LM-PCR a ainsi été utilisée avec succès pour la cartographie des interactions ADN-protéines, le positionnement des nucléosomes ou l'étude des mécanismes de réparations de l'ADN. Appliquée à l'ADNmt, cette technique permet de localiser les extrémités 5' libres générées lors d'un arrêt de la réplication, ce qui en soi est comparable aux cassures simple brin. Cette technique a par exemple permis de déterminer la localisation des sites de fixation du facteur mTERF qui est impliqué dans la régulation de la réplication (Hyvarinen et al., 2007). Associée aux gels 2D, la LM-PCR peut donc dans notre cas, nous permettre d'établir un lien direct entre la zone d'action nos ARN et un arrêt dans la réplication.

Pour mettre en place cette technique, nous avons dû modéliser tout un jeu d'oligonucléotides dont la taille, la température d'annealing et la distance par rapport à l'extrémité 5' ciblée devaient être définies avec précision. Une fois en possession de ces oligonucléotides, la technique consiste en une succession d'amplification comme présenté **Figure 59**. Les détails techniques concernant la séquence des différents oligonucléotides ainsi que les conditions d'amplification sont données **partie II-2.10 de Matériel et Méthodes**.

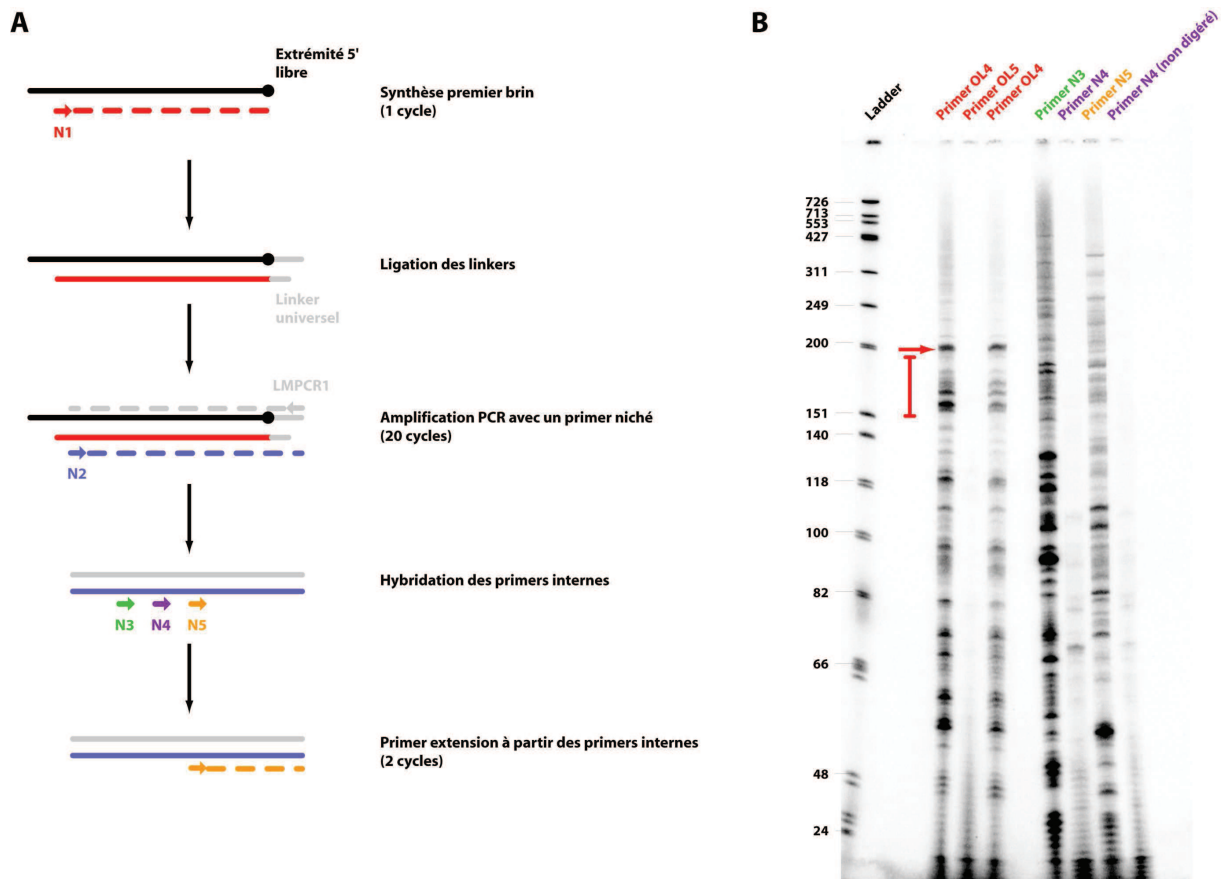


Figure 59 : Principe de la LM-PCR

(A) Les grandes étapes de la LM-PCR. Les différents brins synthétisés ou primers utilisés à chaque étape sont représentés par une couleur donnée. Les détails techniques de cette méthode sont retrouvés dans la partie II-2.10 de Matériel & Méthodes. (B) Résultats de LM-PCR sur les cellules ND5. La localisation du site OriL (flèche rouge) mise en évidence par (Hyvarinen et al., 2007) a été reproduite avec succès. Les résultats obtenus pour la mutation A13514G avec les primers N3 (vert), N4 (violet) et N5 (orange) sont plus variables et ont nécessité la modélisation de nouveaux primers (non présentés ici).

Les premières expériences présentées ici visent à mettre en place et à tester cette stratégie vis-à-vis de notre modèle d'étude. Pour cela, en parallèle du développement de notre méthode, nous avons tenté de reproduire les résultats obtenus dans (Hyvarinen et al., 2007) pour ainsi nous assurer de la bonne marche du protocole, ce qui semble être le cas (Figure 59).

Concernant notre étude, nous avons induit par l'usage d'une enzyme de restriction, une cassure artificielle au sein de l'ADNmt située non loin de la zone de mutation A13514G et nous servant de contrôle positif. Les résultats amenés par la LM-PCR révèlent une efficacité variable en fonction des primers utilisés lors de l'étape d'extension.

C'est pourquoi, dans le but d'améliorer ce signal nous avons modélisé de nouveaux primers (N6 et N7, voir Tableau 13 partie II-2.10 de Matériel et Méthodes) plus proches de la zone

ciblée. Les expériences avec ces nouveaux primers sont en cours de réalisation au laboratoire mais les premiers résultats obtenus sont plutôt concluants et montrent l'apparition d'un fragment dont la taille est en accord avec nos attentes.

En résumé, la LM-PCR semble être une analyse très intéressante et complémentaire à l'électrophorèse bidimensionnelle pour visualiser les zones de pause dans l'ADNmt et établir un lien direct entre la zone d'action de nos ARN et un arrêt dans la réplication.

CONCLUSIONS & PERSPECTIVES

**« Ce n'est pas la fin. Ce n'est même pas le commencement
de la fin. Mais c'est peut être la fin du commencement »**

Winston Churchill

Dans cette dernière partie, revenons-en aux questions que nous nous posons au début de cette étude et voyons quels sont les enseignements que nous pouvons en tirer.

I. Comment démontrer *in vivo* l'impact des ARN anti-répliatif sur la répliation de l'ADNmt mutant ?

La première phase de ce travail doit beaucoup au Dr Caroline Comte, qui durant sa thèse a développé et testé les premières versions d'ARN anti-génomique destinées à la large délétion KSS. Elle a ainsi réussi à montrer qu'il était possible d'adresser dans les mitochondries humaines dont l'ADNmt est porteur d'une large délétion, des oligonucléotides artificiels et d'y induire une diminution de l'hétéroplasmie. Mais pour prouver de manière indéniable la validité de cette approche *in vivo*, encore fallait-il mettre en évidence l'impact de ces ARN sur le mécanisme de répliation. C'est sur la base de cette étude que j'ai été associé au projet portant sur la délétion KSS. Avec cet objectif en tête, j'ai donc adapté à nos besoins une technique permettant la visualisation et l'analyse des intermédiaires de répliation, à savoir l'électrophorèse bidimensionnelle. Après avoir optimisé les conditions d'analyse de nos échantillons, j'ai procédé à une étude comparative des profils de migration des intermédiaires de répliation générés avant et après transfection des cellules. Les résultats obtenus laissèrent apparaître un signal correspondant à l'accumulation d'intermédiaires de même conformation pour les cellules mutantes transfectées. La localisation de ce signal au niveau d'un site spécifique, situé à la jonction des bornes de délétion, confirma le fait que l'ARN FD-H utilisé induit une pause de la répliation à la hauteur de son site d'hybridation. Ceci démontre que l'import des ARN recombinants au sein des mitochondries humaines conduit à un arrêt de la répliation, amenant ainsi à une diminution du taux d'hétéroplasmie. Avec ce nouvel outil à présent à notre disposition au laboratoire, nous avons pu démontrer que les ARN anti-répliatif étaient capables d'affecter spécifiquement la répliation de l'ADNmt mutant *in vivo* et pu prouver la viabilité de notre méthode.

Mais mettons de côté quelques instants l'aspect thérapeutique de cette approche, pour nous intéresser à un aspect plus fondamental : le mécanisme de répliation. A l'heure actuelle, les mécanismes qui président à la répliation de l'ADNmt restent encore l'objet de nombreux questionnements. Comme nous avons pu le voir lors de **l'Introduction (chapitre I-**

6.1.2), 2 grands modèles s'affrontent avec d'un côté le modèle asynchrone de Clayton face auquel on retrouve l'équipe de Ian Holt et leur modèle de réplication synchrone.

L'élaboration d'une stratégie telle que la notre nécessite de prendre en compte la manière dont s'effectue la réplication, mais l'absence d'un consensus sur le modèle qui prévaut complexifie la situation. Mais alors pourquoi ne pas utiliser nos ARN pour sonder le mécanisme de réplication ?

Lors des prémices de la stratégie anti-réplivative, la question ne se posait pas, le modèle asynchrone étant alors le seul modèle existant (Taylor et al., 1997). Mais les résultats obtenus lors de notre étude semblent réfuter cette idée et plutôt abonder le sens du modèle de réplication synchrone.

En effet, dans le cas de la délétion nous avons pu montrer que 2 ARN (FD-L et FD-H) étaient capables d'induire une diminution conséquente du taux d'hétéroplasmie. Or cette diminution est équivalente pour chacun de ces ARN, ce qui semble aller à l'encontre de l'hypothèse d'une réplication asynchrone. Rappelons que selon ce modèle, la réplication est initiée au niveau de l'origine O_H et assure en premier lieu la synthèse du brin H. Dans un second temps, lorsque la fourche de réplication a atteint les deux tiers du génome, l'origine O_L est mise à nu et c'est la réplication du brin L qui débute alors. Si l'on s'en fie à cette théorie, cela voudrait dire que FD-H (qui cible le brin L de l'ADNmt) devrait avoir un effet drastique sur la réplication et bloquer le mécanisme dans son ensemble. Suite à cela, aucune molécule fille ne devrait être synthétisée étant donné qu'en bloquant la réplication du brin H on bloquerait par la même la réplication du brin L. *A contrario*, l'effet de l'ARN FD-L devrait être quant à lui plus mesuré, puisque seule la réplication du brin H serait enrayée et que les molécules filles issues de la réplication du brin H pourraient tout de même voir le jour. Cette inhibition, totale ou partielle selon le cas, se répercuterait sur le niveau d'hétéroplasmie. Or si l'on examine avec attention les résultats obtenus, nous constatons que la baisse engendrée par chacun de ces ARN est équivalente. De plus, lorsque les 2 ARN sont utilisés de manière simultanée, l'inhibition occasionnée est encore plus prononcée ce qui tendrait à dire que la réplication des 2 brins se ferait de manière synchrone.

Sur la base de ces observations, il semble alors possible d'utiliser nos ARN non pas seulement comme des vecteurs thérapeutiques, mais comme de véritables outils d'investigation du mécanisme de réplication.

II. Peut-on optimiser l'effet des ARN anti-répliatif par l'ajout de modifications chimiques ?

Dans le but d'optimiser l'effet transitoire induit sur le taux d'hétéroplasmie par les ARN FD-L et FD-H, nous avons souhaité y apporter certaines modifications par l'adjonction de groupements chimiques variés ou la conversion de l'insert anti-répliatif en ADN. Ces modifications avaient pour but d'augmenter la demi-vie de nos ARN, sans en altérer la capacité d'import dans les mitochondries, et de prolonger la baisse observée sur le taux d'hétéroplasmie. Différents ARN possédant des groupements méthyles ou fluors, une thymidine inversée ou bien encore un insert ADN ont ainsi été modélisés par nos soins et synthétisés par nos collaborateurs de l'Institut de Biologie Chimique et de Médecine Fondamentale de Novossibirsk. Le but de mon étude consista à caractériser l'impact de telles modifications sur la spécificité des ARN et leur effet sur l'hétéroplasmie.

Les résultats obtenus suite à cette étude ont montré une très haute spécificité d'hybridation pour l'ensemble des ARN modifiés, qui sont capables de discriminer l'ADNmt mutant et de s'y fixer. Du point de vue de leur stabilité, nous avons pu démontrer que l'ajout de telles modifications entraîne de manière globale une augmentation de la demi-vie de nos ARN. Néanmoins, cette tendance est variable selon la nature des modifications apportées, l'ajout d'une thymidine inversée ou d'insert ADN étant plus efficace que l'addition d'un groupement fluor.

Pour modéliser ces ARN modifiés, nous sommes partis du squelette d'un ARN ne possédant qu'une boucle d'import (F ou D selon le cas) et avons pu voir que la présence d'une seule de ces boucles était suffisante pour assurer l'import de nos ARN. De plus, avec cette étude nous avons non seulement montré que nous pouvions adresser aux mitochondries des ARN, mais également des oligonucléotides ADN sous la forme de molécules hybrides.

En revanche, bien que la stabilité de ces ARN ait été augmentée, aucun effet n'a pu être induit au niveau de l'hétéroplasmie, l'ajout de modifications chimiques semblant avoir un effet délétère sur la capacité des ARN à induire une diminution de l'hétéroplasmie. Cette perte de fonction de l'activité anti-répliatif des ARN recombinants pourrait s'expliquer par l'incapacité des ARN modifiés à s'hybrider de manière stable à l'ADNmt. Alors bien que l'ajout de modifications chimiques sur la stabilité des ARN soit bénéfique, la question de

départ qui était « peut-on accroître l'effet transitoire des ARN sur l'hétéroplasmie ? » reste toujours en suspens.

Mais pour remédier à ce problème d'autres solutions sont envisageables, telles une expression constitutive et stable des ARN recombinants ou le développement de procédures de transfection moins toxiques pour la cellule. En effet, par le passé nous avons déjà tenté de prolonger l'effet induit par les ARN recombinants via des transfusions transitoires successives. Bien qu'un prolongement de l'effet durant quatre jours ait pu être atteint, cette procédure a ses limites, l'ajout répété d'un agent de transfection dans le milieu de culture se révélant à terme toxique pour les cellules. Pour contrecarrer cet effet, nous tentons de développer au laboratoire des ARN capables de pénétrer dans la cellule en s'affranchissant de l'usage d'un quelconque agent de transfection. Cet aspect développé avec nos collaborateurs de Novossibirsk, et plus particulièrement au laboratoire par Ilya Dovydenko, vise à adjoindre aux ARN recombinants un groupement lipophile leur permettant de franchir la membrane plasmique par endocytose avant d'être importé dans les mitochondries. A terme, ces ARN seraient donc quasi autonomes et pourraient atteindre la matrice mitochondriale sans l'aide d'aucun agent chimique extérieur.

III. Est-il possible d'étendre la stratégie anti-répllicative à des mutations ponctuelles ?

Outre la partie consacrée à la délétion KSS et à son optimisation, l'essentiel de mon travail de recherche a consisté à développer cette stratégie anti-répllicative vis-à-vis de mutations ponctuelles. Cette étude avait débuté avec une mutation ponctuelle située au niveau du gène de l'ARNt^{Leu} (A3243G), puis de la sous-unité COXI (A7339G), mais aucune baisse notable n'avait pu être observée. Cependant, après ces quelques revers de fortune, mes travaux ont finalement pu aboutir à une diminution conséquente du taux d'hétéroplasmie pour des cellules atteintes d'une mutation au niveau du gène codant pour la sous-unité ND5.

Alors comment expliquer cette différence d'efficacité selon la mutation ? Pour notre premier modèle, la mutation affectant le gène de l'ARNt^{Leu}, il semblerait que nous ayons essentiellement joué de malchance en ciblant une zone qui constitue le principal site de fixation du facteur mTERF. Participant à la constitution du nucléoïde, ce facteur est d'une importance capitale pour la régulation des mécanismes de transcription et de réplication,

mais constitue surtout pour nos ARN, un obstacle de plus à franchir. En effet, en couvrant une grande surface du génome, et qui plus est avec une forte affinité pour le site que nous ciblons, mTERF rentre directement en compétition avec nos ARN pour l'accès à l'ADNmt. Pour la mutation A7339G (gène COXI), la situation semble quelque peu différente mais pourrait également s'expliquer par sa localisation au sein de l'ADNmt. En effet, même si un site secondaire de mTERF a été répertorié dans cette région (Hyvarinen et al., 2007), ce dernier ne recouvre pas la zone affectée par la mutation et s'y fixe avec une moindre affinité. Pourtant, nous avons vu par l'expérimentation que les ARN dirigés contre la mutation A7339G étaient importés et dotés d'une haute spécificité vis-à-vis de l'ADNmt mutant. Malgré cela, aucune diminution du taux d'hétéroplasmie n'a pu être observée suggérant que le problème viendrait d'un manque d'accessibilité à l'ADNmt. En prenant en considération le fait que c'est dans cette région que se situe l'origine de réplication O_L ou de multiples origines alternatives (O_L alt), cette hypothèse semble plus que probable et on peut dès lors supposer que les facteurs impliqués dans l'initiation de la réplication encombrant le site visé par les ARN.

Pour notre dernière mutation ponctuelle, celle affectant le gène ND5, le résultat fut tout autre. En effet, une nette diminution du taux d'hétéroplasmie a été observée suite à la transfection des cellules cybrides par l'ARN FD20H^{ND5}. Les caractéristiques structurales de cet ARN ne diffèrent en rien de ceux développés vis-à-vis des mutations précédentes. Tous sont construits sur le même modèle et présentent les 2 boucles nécessaires à l'import, ainsi qu'une séquence apte à cibler spécifiquement l'ADNmt mutant. Par conséquent, un autre paramètre semble à prendre en compte. Or si les ARN ne sont pas en cause, c'est que la solution doit se trouver au niveau de l'ADNmt.

En effet, si l'on compare les différentes mutations étudiées, on constate que celles pour lesquelles une baisse de l'hétéroplasmie a pu être induite (la délétion KSS et la mutation ponctuelle ND5) ont un point commun : leur localisation au sein du génome mitochondrial. Lors de l'introduction, nous avons vu que l'apparition de délétions s'effectuait de manière préférentielle dans une zone située entre les 2 origines de réplication. Il est donc tout à fait envisageable d'imaginer que l'action des ARN anti-répliatifs seraient dépendante de la localisation au sein du génome mitochondrial de la mutation ciblée. Mais pour confirmer ces allégations, d'autres analyses par électrophorèse

bidimensionnelle et LM-PCR méritent d'être menées afin de décortiquer les mécanismes mis en jeu lors de l'hybridation des ARN à l'ADNmt.

Enfin, outre le fait qu'ils démontrent une fois de plus la viabilité de notre méthode, les résultats obtenus lors de cette étude fournissent un argument supplémentaire quant à l'utilisation d'ARN dans le développement d'une stratégie anti-réplivative ciblant l'ADNmt. En effet, alors que molécules chimériques possédant un insert ADN avaient été développées contre la mutation A13514G, seul l'ARN FD20H^{ND5} a été capable d'induire une baisse d'hétéroplasmie. Cette observation est en accord avec le fait que le réplisome peut séparer des hybrides ADN/ADN mais aura plus de mal pour un duplex ARN/ADN comme on peut en retrouver au niveau de la région de la boucle D de l'ADNmt (Bowmaker et al., 2003).

En résumé, les travaux menés durant ma thèse ont permis de :

- Mettre en évidence l'impact des ARN recombinants sur l'arrêt de la réplication de l'ADNmt muté *in vivo*
- Prouver la validité de l'approche anti-génomique dans le cas d'une large délétion dans l'ADNmt
- Caractériser l'impact de modifications chimiques sur la stabilité, l'import et l'efficacité des ARN anti-répliatif
- Modéliser et tester de nombreuses versions d'ARN recombinants s'hybridant de manière spécifique au niveau de régions de l'ADNmt portant des mutations ponctuelles
- Induire une diminution du taux d'hétéroplasmie pour une mutation pathogénique affectant le gène de la sous-unité ND5, suite à l'import mitochondrial d'ARN recombinants

Ce dernier point est des plus important, car même faible cette baisse est très prometteuse, une diminution de quelques pourcents du taux d'hétéroplasmie étant suffisante pour restaurer partiellement les fonctions mitochondriales.

Dans la continuité de ce travail, les perspectives sont donc nombreuses. Tout d'abord, les mécanismes qui gouvernent l'import de nos ARN recombinants recèlent encore bon nombre de secrets. Dans ce sens, une des priorités serait d'identifier les facteurs

protéiques impliqués dans la prise en charge et l'import des ARN au sein des mitochondries. Ensuite, toujours sur le plan fondamental, il serait intéressant de détourner la fonction première de nos ARN et de les utiliser comme un outil d'investigation. Ceci nous permettrait ainsi de comprendre plus en détails à la fois le mode d'action de nos ARN et de manière plus générale les mécanismes de réplication qui s'appliquent, plusieurs hypothèses étant avancées quant au mode de réplication de l'ADNmt.

D'un point de vue plus appliqué, l'un des principaux obstacles dans l'étude des maladies mitochondriales est, comme nous l'avons vu, la disponibilité de modèles animaux dont les caractéristiques moléculaires et biochimiques correspondent à la mutation étudiée. Pour se rapprocher des conditions physiologiques, de nouveaux modèles d'étude seraient à envisager telles des cultures primaires ou des cellules différenciées. Au regard d'aspects plus appliqués, un modèle murin semble également une étape incontournable dans le développement de notre stratégie. Pour cela, les fameuses « Mito-mice », ces souris arborant une mutation mitochondriale associée à de multiples symptômes constitueraient un modèle de choix. Mais le passage à ce stade de la stratégie amène également la question du mode d'administration des ARN au sein d'organismes vivants. Pour cela on peut envisager l'utilisation de vecteurs viraux ou une administration par voie intraveineuse, les ARN étant alors associés à des groupements lipophiles.

En conclusion de ce travail, les recherches menées au cours de ma thèse ont permis de montrer qu'une approche anti-génomique exploitant le système d'import naturel des ARN, mais surtout ciblant une mutation ponctuelle dans l'ADNmt était réalisable et efficiente. Et même si le chemin qui mène à un traitement applicable chez l'Homme est encore long, cette étude constitue un premier pas des plus encourageant dans le développement de thérapies à l'encontre des maladies mitochondriales.

MATERIEL & METHODES

**« On ne peut se passer d'une méthode
pour se mettre en quête de la vérité des choses »**

René Descartes

I. Matériel

1. Lignées cellulaires

- **Cellules 143B.TK-** : cellules d'ostéosarcome humain déficientes en thymidine kinase et nous servant de lignée contrôle.

Cellules généreusement fournies par : Dr Eric Shoubridge (Institut Neurologique de Montréal, Université McGill, Montréal, Canada)

- **Cellules cybrides TSFRmt** : lignée cellulaire cybride issue de la fusion de cytoplastes de fibroblastes prélevés d'un patient porteur d'une délétion de 7075 pb et d'une lignée cellulaire de type rho0 (cellules immortalisées d'ostéosarcome 143B). La délétion entraîne la disparition des 9 gènes structuraux (*MT-ND3*, *MT-ND4*, *MT-ND4L*, *MT-ND5*, *MT-ND6*, *MT-CO3*, *MT-ATP6*, *MT-ATP8* ainsi qu'une partie de *MT-CYB*) et de 6 gènes d'ARNt (*MT-TE*, *MT-TL2*, *MT-TS2*, *MT-TH*, *MT-TR* et *MT-TG*). Ces cellules présentent en culture un taux d'hétéroplasmie de $65\pm 2\%$ et un déficit respiratoire de l'ordre de $10\pm 2\%$ en comparaison de la lignée contrôle.

Cellules généreusement fournies par : Dr Anne Lombès (CRICM, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris, France)

- **Cellules cybrides MELAS A3243G** : 2 lignées cellulaires de type rho0 fusionnées à des cytoplastes de myoblastes provenant d'un patient porteur de la mutation A3243G dans l'ADNmt au niveau du gène *MT-TL1* codant pour l'ARNt^{Leu}(UUR). La première (MELAS-1) présente un taux d'hétéroplasmie de $85\pm 5\%$ tandis que la seconde lignée cellulaire (MELAS-2) atteint pour sa part un taux d'hétéroplasmie $90\pm 5\%$.

Cellules généreusement fournies par : Pr Robert Lightowlers (Wellcome Trust Centre for Mitochondrial Research, Newcastle, Royaume-Uni).

- **Cellules cybrides COX I A7339G** : lignée cellulaire de type rho0 fusionnée à des cytoplastes de myoblastes. La présence de la mutation A7339G dans le gène *MT-CO1* codant pour la sous-unité respiratoire COX I induit un codon stop prématuré associé à un défaut dans l'assemblage du complexe respiratoire (D'Aurelio et al., 2001). Ces cellules présentent un taux d'hétéroplasmie de 68±5%.

Cellules généreusement fournies par : Pr Rudolf Wiesner (Centre de Physiologie et de Pathophysiologie, Cologne, Allemagne)

- **Cellules cybrides ND5** : lignée cellulaire de type rho0 fusionnée à des cytoplastes de fibroblastes obtenus après biopsie d'un patient porteur de la mutation A13514G au niveau du gène *MT-ND5* (Corona et al., 2001). 4 lignées clonales ont été utilisées pour cette étude : une lignée sauvage (Cy70), une à 35%, une autre présentant 50% de taux d'hétéroplasmie (Cy36) et une ayant été mesurée à 80% d'hétéroplasmie (Cy31). Ces cellules présentent une résistance à la kanamycine à raison de 100 µg/ml de milieu de culture.

Cellules généreusement fournies par : Dr Massimo Zeviani (Institut Neurologique National Carlo Besta, Milan, Italie)

2. Milieux de culture

Les cellules sont cultivées à 37°C et sous 5% de CO₂ dans du DMEM (Dubelcco's modified Eagle's Medium) (Sigma) contenant 4,5 g/l de glucose additionné de 10% de sérum fœtal de veau (*Gibco*) décomplémenté 40 minutes à 55°C, d'un mélange de pénicilline/streptomycine (*Gibco*), d'uridine (50 mg/l) (*Gibco*) et de fungizone (2,5 mg/l) (*Gibco*) ainsi que de bicarbonate de sodium (3,7 g/l) pour tamponner le milieu. Le milieu préparé stérilement est filtré et conservé à 4°C.

Lors d'une croissance ralentie, le DMEM peut être remplacé par un milieu plus riche de type F14 à 6 g/l de glucose et contenant de l'EGF.

3. Outils informatiques

- **Mfold** : programme de modélisation de structures secondaires d'ARN (ou d'ADN) principalement via des méthodes thermodynamiques (Zuker, 2003).
@ : <http://mfold.rna.albany.edu/?q=mfold>

- **BLAST (Basic Local Alignment Search Tool)** : programme de recherche heuristique permettant la comparaison d'alignements et la recherche de similarité entre une ou plusieurs séquences (Altschul et al., 1990).
@ : <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>

- **OligoCalc** : outil bio-informatique utilisé dans le calcul des températures de fusion des oligonucléotides et la détermination de ses propriétés physiques (poids moléculaire, pourcentage en GC...) (Kibbe, 2007).
@ : <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/OligoCalc.html>

- **Oligo Analyzer** : outil en ligne permettant comme OligoCalc le calcul de la température de fusion d'un oligonucléotide ainsi que d'autres caractéristiques physico-chimiques (masse molaire, coefficient d'extinction...). Cet outil permet également de prendre en compte les conditions ioniques et la concentration des différents composants dans le calcul de ces différents éléments.
@ : <http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>

- **Mitomap** : base de données compilant l'ensemble des données portant sur le génome mitochondrial humain (Kogelnik et al., 1996).
@ : <http://www.mitomap.org/MITOMAP>

- **ImageJ** : logiciel multiplateformes développé par le NIH disponible en open source pour le traitement et l'analyse d'images. Par l'ajout de nombreux plugins et macros, il permet d'étendre ses fonctionnalités à l'analyse 3D, l'ajout de filtres, la quantification de signaux... (Schneider et al., 2012).
@ : <http://rsbweb.nih.gov/ij/>

Plugins utilisés :

- **JACoP** (Just Another Colocalization Plugin) : compilation d'un ensemble d'outils destinés à la co-localisation (Bolte and Cordelieres, 2006).
@ : <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/track/jacop.html>
- **3D Viewer** : visionneuse 3D pour permettre la visualisation des piles d'images, volumes, surface et coupes d'images (Schmid et al., 2010).
@ : <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/3d-viewer/index.html>
- **3D Object Counter** : ce plugin permet de dénombrer les objets 3D d'une pile d'images et affiche pour chacun le volume, la surface, le centre de gravité et le centre d'intensité (Bolte and Cordelieres, 2006).
@ : <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/track/objects.html>
- **3D ImageJ Suite** : permet d'augmenter les possibilités d'analyse 3D d'ImageJ (Iannuccelli et al., 2010).
@ : http://imagejdocu.tudor.lu/doku.php?id=plugin:stacks:3d_ij_suite:start

Dans le processus d'analyse de réseaux, une macro supplémentaire a été développée par Thomas Boudier (Université Pierre et Marie Curie, Paris, France) et dont voici l'exécutable :

```
requires("1.46g");
rename("image");
w=getWidth();
h=getHeight();
s=nSlices();
selectWindow("image");
temp=getDirectory("home");
print("temp",temp);
run("3D Manager");
Ext.Manager3D_AddImage();
Ext.Manager3D_Measure();
selectWindow("3D Measure");
IJ.renameResults("3D Measure","Results");
newImage("color size", "8-bit Black", w, h, s);
selectWindow("color size");
vtab=newArray(nResults);
for(i=0;i<nResults;i++) vtab[i]=getResult("Vol (unit)",i);
Array.getStatistics(vtab, vmin, vmax, vmean, vstd);
for(i=0;i<nResults;i++) {
    Ext.Manager3D_Select(i);
    v=getResult("Vol (unit)",i);
    s=(v-vmin)/(vmax-vmin);
    Ext.Manager3D_FillStack(255*s, 255*s, 255*s);
}
run("sizeLUT");
setSlice(s/2+1);
run("Enhance Contrast", "saturated=0.35");
print("finished");
```

II. Méthodes

1. Culture cellulaire

1.1 Culture des cellules

1.1.1 Décongélation

Les cellules sont conservées à -150°C dans 300 μl de tampon SVF-DMSO. Lors de la décongélation, les cellules sont incubées 2 min à 37°C , puis on ajoute 300 μl de DMEM préchauffé et les cellules sont ré-incubées 1 min. On répète l'opération 3 fois de suite puis on centrifuge les cellules 10 min à 600xg. Le culot est resuspendu dans du DMEM et les cellules mises en culture.

1.1.2 Culture

Pour leur culture, les cellules sont réparties au choix dans des puits (2-4-10 cm^2), des flasques (25-75-175 cm^2) (*Sarstedt*) ou dans des chambres de plaques Lab-Tek® (*Nunc*) dédiées à la microscopie (1-2-4 cm^2) et cultivées à 37°C et sous 5% de CO_2 dans du DMEM (*Sigma*).

1.1.3 Détachement

On appelle « passage » l'action de décoller les cellules de leur support lorsqu'elles sont à confluence, pour les changer de contenant et perpétuer leur croissance. Pour cela, le milieu de culture est ôté et remplacé par du tampon PBS-EDTA, les cellules incubées pendant 10 min à 37°C , ce après quoi on les détache et les centrifuge à 600xg pendant 10 min. Le surnageant est aspiré et les cellules remises en suspension dans du DMEM et réparties dans leur nouveau contenant.

1.1.4 Congélation et stockage des cellules

Pour la congélation, les cellules sont détachées selon le protocole précédemment décrit et resuspendu dans 300 µl de **tampon SVF-DMSO** en lieu et place du DMEM. Le tube est ensuite placé dans une cryoboîte (*CoolSystem™*) à -80°C, où la température diminue d'1°C/min avant d'être stockées à -150°C.

1.1.5 Comptage des cellules

Pour le comptage des cellules, 2 méthodes sont envisageables. La première à l'aide d'une cellule de Malassez. Pour cela, 50 µl d'une suspension cellulaire sont additionnés d'un volume de bleu Trypan (0,4% dans PBS 1x) et déposés sur une plaque de comptage Kovaslide (*Hycor Biomedical*). Les cellules sont alors comptées manuellement sous microscope inversé. La seconde méthode est quant à elle automatique et se fait à l'aide d'un appareil de comptage portatif, le Scepter™ (*Merck-Millipore*). Pour cela, les cellules sont resuspendues dans du tampon **PBS 1x** et la mesure s'effectue sur une aliquote de 100 µl.

Tampon SVF-DMSO : sérum de veau fœtal additionné de 10% DMSO

Tampon PBS-EDTA : PBS 1x ; 1 mM EDTA

Tampon PBS 1x : 1,5 mM KH₂PO₄ ; 150 mM NaCl ; 3 mM Na₂HPO₄, pH 7,4 (*Sigma*)

1.1.6 Détection de contamination par des mycoplasmes

Dans certains cas, les cellules peuvent être contaminées par la présence de mycoplasmes perturbant l'expression cellulaire. Pour détecter la présence de tels parasites, un test assez simple est réalisable et consiste en une amplification PCR d'un fragment du gène codant pour l'ARNr 16S de *Mycoplasma sp* ([Dussurget and Roulland-Dussoix, 1994](#)). Pour cela, 2 ml de milieu ayant été en contact avec les cellules pendant au minimum 2 jours sont prélevés et centrifugés 5 min à 600xg. Le surnageant est récupéré et centrifugé 10 min à 16 000xg. Le culot obtenu est alors repris dans 50 µl d'eau stérile. La détection de mycoplasmes s'effectue donc par une simple PCR (**Tableau 4**). Le milieu réactionnel se compose comme suit : 2 µl de la suspension cellulaire, 0,25 µl de primer 3 à 100 µM, 0,25 µl

de primer 5 à 100 μM , 0,25 μl de primer UNI à 10 μM , 1,25 μl de dNTP (2,5 mM), 5 μl de tampon HF, 0,5 μl d'enzyme haute fidélité Phusion[®] (*Thermo Fisher Scientific*) et d'eau stérile qsp 25 μl .

En cas de contamination, une bande de 772 pb est alors visible sur gel en addition d'une bande non spécifique de 1 055 pb également retrouvée dans le cas de contaminations dues à des levures ou des bactéries.

Oligonucléotides	Conditions PCR
Primer ARN 3 5'- ACG AGC TGA CGA CAA CCA TGC AC- 3'	98°C : 30s
Primer ARN 5 5'- AGA GTT TGA TCC TGG CTC AGG A -3'	98°C : 30s 61°C : 1 min 30s 72°C : 1 min 30s
Primer UNI 5'- TAA TCC TGT TTG CTC CCC AC -3'	72°C : 10 min

Tableau 4 : Primers et conditions de PCR pour la détection de mycoplasmes

1.2 Transfection

Pour être transfectées, les cellules sont cultivées jusqu'à atteindre une confluence de 80% selon les recommandations du fournisseur de l'agent de transfection. Le milieu de culture est ôté et remplacé par de l'Opti-MEM[®], milieu dépourvu de sérum, préalablement préchauffé à 37°C. La transfection est réalisée à l'aide de Lipofectamine[™] 2000 (*Invitrogen*) selon les proportions indiquées par le fournisseur à raison de 0,5 $\mu\text{l}/\text{cm}^2$. La lipofectamine est ajoutée à de l'Opti-MEM et incubée 5 min à température ambiante. On ajoute un volume d'Opti-MEM où a été dilué l'ARN à raison de 1 $\mu\text{g}/10\text{cm}^2$. Après 25 min d'incubation à température ambiante, on ajoute ce mélange Lipofectamine/ARN aux cellules et on remet à 37°C pendant 6 à 8h, ce après quoi on remplace le milieu de transfection par du DMEM préchauffé. Pour récupérer les cellules, il faut attendre au moins 24h après la transfection.

2. Techniques relatives à l'étude des acides nucléiques

2.1 Extraction d'ADN total

Pour extraire l'ADN total, on part d'un culot sec d'1 cm^2 de cellules obtenu comme indiqué dans le **paragraphe II-1.1.3**. A ce culot sec, on ajoute 500 μl de **tampon de solubilisation RSB** et 10 μl de protéinase K (*Promega*) à 20 mg/ml. Après avoir resuspendu le

culot, on incube à 50°C pendant 2h (ou le cas échéant à 37°C pour la nuit). Pour la précipitation, on ajoute 50 µl de NaCl 5M et 500 µl d'isopropanol, on agite et on met à -20°C pour la nuit. L'ADN est ensuite centrifugé 30 min à 16 000xg, le culot est lavé à l'éthanol 80% et resuspendu dans 50 µl de **tampon TE**.

Tampon RSB : 10 mM Tris-HCl pH 7,5 ; 10 mM NaCl ; 25 mM EDTA ; 1% SDS

Tampon TE : 10 mM Tris-HCl ; 1 mM EDTA

2.2 Extraction d'ARN total

L'extraction d'ARN se fait également à partir d'un culot sec de cellules d'1 cm². Les cellules sont lysées dans 100 µl de TRIzol[®] (Ambion) et incubées 5 min à température ambiante. On ajoute ensuite 20 µl de chloroforme, on vortexe et on incube à nouveau 3 minutes à température ambiante avant de centrifuger à 16 000xg à 4°C pendant 15 minutes. La phase supérieure est récupérée et additionnée de 168 µl d'isopropanol pour la précipitation à -20°C pendant la nuit. Les ARN sont centrifugés 30 min à 16 000xg et 4°C, lavés à l'éthanol 80%, le culot séché puis repris dans 20 µl d'eau milliQ stérile.

2.3 Isolement d'ARN mitochondrial

Là encore, on procède à partir d'un culot sec de cellules issues d'une culture de 75 cm². Après centrifugation, les cellules sont reprises dans 1 ml de **tampon MB-BSA**, un dixième de la suspension étant conservée pour l'analyse des ARN totaux. Les cellules sont cassées de manière mécanique à l'aide d'une seringue 2 ml munie d'une aiguille 23G x 1'' (0,6 x 25 mm) (Terumo[®]) ou d'un homogénéiseur de Dounce avec un piston ultra-fin. Après une vingtaine de passages, le lysat est centrifugé 6 min à 1 200xg, le surnageant récupéré et remis à centrifuger et cela 3 fois de suite. Le surnageant est à nouveau repris et centrifugé mais cette fois à 16 000xg pendant 10 min. Le culot obtenu est ensuite resuspendu dans 300 µl de **tampon MB** auxquels on ajoute 300 µl de **tampon RNase A** (à 10 µg/ml) dans le but de dégrader les ARN de la fraction cytosolique ou s'accrochant à la membrane externe des mitochondries. Après 7 min à température ambiante, on ajoute 800 µl de **tampon RNase STOP** et on centrifuge 10 min à 16 000xg. Le surnageant est ôté et le culot repris dans 300 µl

de tampon MB et 20 μ l de digitonine (1 mg/ml) sont ajoutés pour générer des mitoplastes (mitochondries dépourvues de membranes externes). L'incubation se fait à température ambiante pendant 7 min. Après dilution dans 2 volumes de tampon MB, la suspension est centrifugée à 16 000xg pendant 20 min à 4°C, ce après quoi le culot de mitochondries est lavé 3 fois avant d'être repris dans du TRIzol® et que l'on procède à l'extraction comme indiqué dans le paragraphe précédent.

Tampon MB : 0,6 M Sorbitol (ou Mannitol) ; 1 mM EDTA ; 10 mM Na-PIPES pH 6,7

Tampon MB-BSA : Tampon MB + BSA 10 mg/ml

Tampon RNase A : Tampon MB + RNase A 10 μ g/ml ; 4 mM MgCl₂

Tampon RNase STOP : Tampon MB + 5 mM EDTA

2.4 Amplification d'ADN

2.4.1 Amplification des matrices pour la transcription T7 par PCR

Pour synthétiser les différents ARN utilisés dans cette étude, nous avons tout d'abord amplifié par PCR la matrice servant à la transcription *in vitro*. Pour cela, la réaction de polymérisation est effectuée dans un volume réactionnel de 50 μ l comprenant 1 μ l de matrice (soit environ 40ng), 4 μ l de dNTP (à 2,5 mM), 0,5 μ l de chaque primer (à 100 μ M), 10 μ l de tampon HF (High-Fidelity) 5x, 1 unité de polymérase haute fidélité Phusion® (*Thermo Fisher Scientific*) et de l'eau milliQ stérile qsp 50 μ l. Une fois la réaction effectuée, le produit d'amplification est déposé sur gel d'agarose 1% ou gel natif de polyacrylamide 10%. L'ensemble des matrices et des couples d'amorces permettant la synthèse des différents ARN pour chacune des 4 mutations étudiées sont référencés dans les **Tableaux 5 et 6**.

Oligonucléotides	Température d'annealing	Conditions PCR
Primer Prom T7 5'- GGG ATC CAT AAT ACG ACT CAC TAT A- 3'	49,3°C	98°C : 30s 98°C : 30s 52°C : 30s 72°C : 1 min 72°C : 10 min x 30 cycles
Primer FD rev 5'- AAG AGC CCT GTA GGG -3'	48°C	
Primer HF rev 5'- TGG AGC CCT GTA GGG -3'	50°C	

Tableau 5 : Primers et conditions de PCR pour l'amplification des matrices

ARN	Séquence	Amorces
A3243G		
FD8L ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GGC AGG GCG AGC CCC CTA CAG GGC TC -3'	Prom T7 + FD rev
FD8H ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GCC CTG CCG AGC CCC CTA CAG GGC TC -3'	Prom T7 + FD rev
FD9L ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC TGG CAG GGC GAG CCC CCT ACA GGG CTC -3'	Prom T7 + FD rev
FD9H ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GCC CTG CCA GAG CCC CCT ACA GGG CTC -3'	Prom T7 + FD rev
FD10L ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC ATG GCA GGG CGA GCC CCC TAC AGG GCT C -3'	Prom T7 + FD rev
FD10H ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GCC CTG CCA TGA GCC CCC TAC AGG GCT C -3'	Prom T7 + FD rev
FD11H ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GCC CTG CCA TCG AGC CCC CTA CAG GGC TC -3'	Prom T7 + FD rev
FD14L ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC TAA GAT GGC AGG GCG AGC CCC CTA CAG GGC TC -3'	Prom T7 + FD rev
FD14H ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GCC CTG CCA TCT TAG AGC CCC CTA CAG GGC TC -3'	Prom T7 + FD rev
FD16L ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GTT AAG ATG GCA GGG CGA GCC CCC TAC AGG GCT C -3'	Prom T7 + HF rev
FD16H ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GCC CTG CCA TCT TAA CGA GCC CCC TAC AGG GCT C -3'	Prom T7 + FD rev
FD18L ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC TTG TTA AGA TGG CAG GGC GAG CCC CCT ACA GGG CTC -3'	Prom T7 + FD rev
FD19H ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GCC CTG CCA TCT TAA CAA AGA GCC CCC TAC AGG GCT C -3'	Prom T7 + FD rev
FD20L ^{ARNL}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GAT GGC AGG GCC CGG TAA TCG AGC CCC CTA CAG GGC TC -3'	Prom T7 + HF rev
A7339G		
FD16L ^{COXI}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC TCG AGG CGA AAA GTC CGA GCC CCC TAC AGG GCT C -3'	Prom T7 + FD rev
FD16H ^{COXI}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GGA CTT TTC GGC TCG AGA GCC CCC TAC AGG GCT C -3'	Prom T7 + HF rev
FD20L ^{COXI}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GCT TCG AGG CGA AAA GTC CTG AGC CCC CTA CAG GGC TC -3'	Prom T7 + FD rev
FD20H ^{COXI}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC ATT AGG ACT TTT CGC CTC GAG AGC CCC CTA CAG GGC TC -3'	Prom T7 + HF rev
A13514G		
FD16L ^{NDS}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC ACT CCA AAG GCC ACA TGA GCC CCC TAC AGG GCT C -3'	Prom T7 + FD rev
FD16H ^{NDS}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC ATG TGG CCT TTG GAG TGA GCC CCC TAC AGG GCT C -3'	Prom T7 + FD rev
FD20L ^{NDS}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC ACT CCA AAG GCC ACA TCA TCG AGC CCC CTA CAG GGC TC -3'	Prom T7 + FD rev
FD20H ^{NDS}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GAT GAT GTG GCC TTT GGA GTG AGC CCC CTA CAG GGC TC -3'	Prom T7 + FD rev
FD25L ^{NDS}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC GTT TCT ACT CCA AAG GCC ACA TCA TGA GCC CCC TAC AGG GCT C -3'	Prom T7 + FD rev
FD25H ^{NDS}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC ATG ATG TGG CCT TTG GAG TAG AAA CGA GCC CCC TAC AGG GCT C -3'	Prom T7 + FD rev
KSS		
FD-L ^{KSS}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC CTC TTT ACA GTG CTT AGT TCT CGA GCC CCC TAC AGG GCT C -3'	Prom T7 + FD rev
FD-H ^{KSS}	5'- TAA TAC GAC TCA CTA TAG CGC AAT CGG TAG CGC AGT AAG CAC TGT AAA TGA GCC CCC TAC AGG GCT C -3'	Prom T7 + FD rev

Tableau 6 : Séquences des matrices servant à la synthèse des ARN et couples d'amorces utilisés pour leur synthèse

Dans ce tableau sont indiquées : la séquence du promoteur T7 (en vert), les parties correspondant aux boucles d'import (en bleu) et la position de la mutation ponctuelle (en rouge). Dans la dernière colonne, sont mentionnées les amorces nécessaires à la synthèse de l'ARN correspondant.

2.4.2 Amplification par PCR quantitative en temps réel : mesure du taux d'hétéroplasmie des cellules porteuses de la délétion

La PCR quantitative en temps réel consiste à suivre l'amplification d'un acide nucléique cible au cours du temps. Les quantités d'ADN présentes dans chaque échantillon sont ensuite calculées à partir de la cinétique d'amplification. Le suivi de l'amplification de l'ADN a été réalisé par l'intermédiaire d'un agent intercalant, le SYBR Green® (*Biorad*) qui émet de la fluorescence lorsqu'il s'associe aux molécules d'ADN double brin produit pendant la réaction de PCR. La fluorescence est ainsi directement corrélée à la quantité d'ADN double brin présente dans le milieu réactionnel. A partir de la courbe d'amplification, le cycle seuil (Ct) est déterminé. Il correspond au cycle de PCR à partir duquel la fluorescence émise par le SYBR Green® présent dans l'échantillon dépasse le bruit de fond déterminé par la ligne de

base. Au cycle seuil, la quantité d'ADN amplifiée est proportionnelle à la quantité initiale d'ADN présente dans l'échantillon.

Le protocole permettant de calculer le taux d'hétéroplasmie dans les cellules cybrides porteuses de la délétion de 7 075 pb a été élaboré dans le laboratoire d'Anne Lombès, (CRICM, Paris) et s'appuie sur la comparaison d'un fragment aspécifique hors de la délétion et d'un fragment spécifique de l'ADNmt sauvage au sein de la zone délétée.

Les amplifications ont été réalisées par le thermocycleur MyiQ (*Biorad*) et les analyses ont été opérées grâce au logiciel MyiQ™ Real-Time PCR Detection System Software Version 1.0 (*Biorad*). Les réactions de PCR ont été réalisées dans 20 µL de milieu réactionnel composé de 3 µL d'H₂O, 1 µL d'amorce 1 095F ou 11 614F à 10 pmoles/µL, 1 µL d'amorce 1 305B ou 11 778B à 10 pmoles/µL, 10µL de iQ Syber Green SuperMix (*Biorad*) et 5 µL d'ADN total dilué 100x (environ 5 ng). Les conditions d'amplification sont indiquées dans le **Tableau 7**.

Oligonucléotides	Taille fragment amplifié	Gène amplifié	Conditions PCR
Primer 1 095F 5'- TAG CCC TAA ACC TCA ACA GT- 3' Primer 1 305B 5'- TGC GCT TAC TTT GTA GCC TTC AT -3'	210 pb (nucléotides 1 095 - 1 305)	gène <i>MT-RNR1 (ARNr 12S)</i> fragment aspécifique (ADNmt total)	95°C : 10 min 95°C : 30s 60°C : 30s 72°C : 1 min x 40 cycles
Primer 11 614F 5'- CAT TGC ATA CTC TTC AAT CAG C -3' Primer 11 778B 5'- CGA CTG TGA GTG CGTT -3'	164 pb (nucléotides 11 614 - 11 778)	gène <i>MT-ND4 (protéine ND4)</i> fragment spécifique (ADNmt wild-type)	72°C : 10 min

Tableau 7 : Primers et conditions de PCR pour la mesure du taux d'hétéroplasmie de la délétion par PCR quantitative

La quantification absolue du nombre de copies d'ADNmt sauvage et délété dans les échantillons d'ADN total est réalisée grâce à une gamme étalon. Pour cela, des fragments d'ADNmt correspondant aux nucléotides 109 à 1 714 (région du gène de l'ARNr 12S) et aux nucléotides 10 739-11 839 (région contenue dans la délétion) ont été clonés dans un plasmide pUC119. Chaque plasmide linéarisé a été utilisé en dilution de 10⁷ à 10⁴ copies par puit et amplifié avec les amorces 1095 F / 1 305B soit 11 614F/11 778B. Chaque réaction à partir d'un même échantillon d'ADN est réalisée en triplicat et la déviation standard calculée par le logiciel MyiQ™. Si la déviation standard entre les trois cycles seuil du triplicat est inférieure ou égale à 2.10⁻¹, le nombre de copies d'ADNmt total ou sauvage est calculé.

La formule permettant de calculer le taux d'hétéroplasmie est la suivante :

$$\begin{aligned} \text{TH} &= (\text{ADNmt délété})/(\text{ADNmt total}) \\ &= [1 - ((\text{ADNmt sauvage})/(\text{ADNmt total}))] \times 100 \end{aligned}$$

Le référentiel à 0% d'hétéroplasmie est calculé à partir d'un échantillon d'ADN total extrait de cellules 143B sauvages.

2.4.3 Amplification par PCR et analyse des fragments de restriction : mesure du taux d'hétéroplasmie pour les mutations ponctuelles

Dans le cas de mutations ponctuelles, l'estimation du niveau d'hétéroplasmie n'est pas envisageable par la méthode de qPCR. Pour mesurer l'évolution de ce taux nous nous appuyons l'existence d'un site de restriction lié à la présence de la mutation. Cette méthode a été développée et optimisée pour chacune des mutations ponctuelles étudiées. L'ADN total ainsi extrait (**voir paragraphe II-2.1**) est amplifié au niveau de la région comprenant la mutation et 2 µl du produit d'amplification sont déposés sur gel de polyacrylamide 10%. Après migration, le gel est coloré au bromure d'éthidium et les produits obtenus sont quantifiés pour que la même quantité de produit PCR soit digérée (**Tableau 8**).

	Oligonucléotides	Conditions PCR	Enzyme de restriction	Taille fragments restriction (pb)
A3243G	5'- GTA ATC CAG GTC GGT TTC T -3' 5'- CGT TCG GTA AGC ATT AGG -3'	94°C : 30s 60°C : 30s 72°C : 1 min x 30 cycles	Apal (GGGCC/C) à 25°C	300 ↓ 165 / 135
A7739G	5'- CGC CAA AAT CCA TTT CAC TA -3' 5'- GCT GCA TGT GCC ATT AAG A- 3'	94°C : 30s 60°C : 30s 72°C : 1 min x 30 cycles	BstBI (TT/CGAA) à 65°C	518 ↓ 336 (254/82) / 182
A13514G	5'- CAT ACC TCT CAC TTC AAC CTC C-3' 5'- AGG CGT TTG TGT ATG ATA TGT TTG C -3'	94°C : 30s 50°C : 1 min 72°C : 1 min x 30 cycles	HaeIII (GG/CC) à 37°C	125 ↓ 80 / 45

Tableau 8 : Primers, conditions de PCR et de digestion pour la mesure du taux d'hétéroplasmie des mutations ponctuelles

2.5 Synthèse d'ARN

2.5.1 T7 transcription

La synthèse des différents ARN est effectuée par T7 transcription grâce au kit T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Production System (*Promega*). Pour cela, 8 µl de produit PCR non purifié sont incubés dans 10 µl de tampon RiboMAX Express T7 2x (contenant déjà les NTP) et 2 µl d'un mélange d'enzymes (T7 ARN Polymérase, pyrophosphatase, RNasine). Le milieu de réaction est incubé à 37°C durant la nuit, puis on y ajoute 1 µl de DNase I et on incube encore 30 min avant d'ajouter un volume de **tampon de charge STOP**. Le mélange est chauffé 3 min à 95°C avant d'être déposé sur gel d'acrylamide 12%, 8M urée, TBE 1x. Le gel est observé sous UV et les bandes correspondant aux transcrits sont excisées et incubées dans 600 µl de **tampon d'éluion** et 60 µl de phénol acide sous agitation (2 000 rpm) pendant la nuit à 4°C. L'éluat est ensuite précipité dans 3 volumes d'éthanol 100% et 1/10^e de volume d'acétate de sodium 3 M.

Tampon de charge STOP : 98% (v/v) formamide ; 5 mM EDTA ; 0,02% bleu de xylène-cyanol ; 0,02% bleu de bromophénol

Tampon d'éluion : 0,5 M acétate de sodium; 10 mM acétate de magnésium; 0,1 mM EDTA; 0,1% SDS

2.5.2 T7 transcription d'ARN marqué avec un fluorophore

Pour les études par microscopie, les ARN ont été synthétisés en y incorporant un nucléotide portant un fluorophore. L'ARN FD20H^{ND5} est ainsi transcrit en présence d'uridine liée au fluorophore Alexa Fluor 488 (ChromaTide® Alexa Fluor® 488-5-UTP, *Invitrogen*). Dans cette étape, la transcription s'effectue d'une manière différente de celle utilisée pour les ARN non fluorescents. Il est important de noter que l'ensemble des étapes sont réalisées dans des tubes opaques. Le milieu de réaction est le suivant : 1 µl d'ATP 10 mM, 1 µl de CTP 10 mM, 1 µl de GTP 10 mM, 0,75 µl d'UTP 10 mM, 2,5 µl de ChromaTide® Alexa Fluor® 488-5-UTP 1 mM, 4 µl de tampon de transcription 5x (*Promega*), 2 µl de DTT 100 mM, 1 µl de RNase OUT 40U/µl (*Invitrogen*), 2 µl de produit de PCR R20 à 700 ng/µl, 0,5 µl de T7 ARN polymérase à 80 U/µl (*Promega*) et de l'eau milliQ stérile qsp 20 µl.

Le milieu est incubé pendant 4h à 37°C puis on rajoute 0,5 µl de T7 RNA polymérase avant de remettre à incuber pour la nuit à 37°C. Le lendemain, on dilue le milieu réactionnel dans 200 µl d'eau milliQ stérile et 200 µl de phénol acide. Après 10 minutes de centrifugation à 16 000xg à 4°C, la phase supérieure est prélevée et on y ajoute 3 volumes d'éthanol 100% et 1/10^e de volume d'acétate de sodium 3M. Après précipitation à -20°C pendant la nuit, l'ARN est centrifugé, lavé et repris dans 20 µl d'eau milliQ stérile. Le dosage de l'ARN et l'estimation du nombre de fluorophores par molécule d'ARN est réalisée par spectrophotométrie au nanodrop (*Thermo Fisher Scientific*), en comparant l'absorbance du fluorophore à 492 nm et celle des bases azotées à 260 nm selon et en appliquant la formule suivante :

$$\text{Base/Fluo} = (A_{\text{base}} \times \epsilon_{\text{fluo}}) / (A_{\text{fluo}} \times \epsilon_{\text{base}}) \text{ où :}$$

ϵ_{fluo} est le coefficient d'extinction du fluorophore (= 62 000 cm⁻¹M⁻¹)

ϵ_{base} est le coefficient d'extinction moyen d'une base dans l'ARN (= 8 250 cm⁻¹M⁻¹)

A_{base} se calcule quant à lui par :

$$A_{\text{base}} = A_{260} - (A_{\text{fluo}} \times \text{FC}_{260}) \text{ où FC est le facteur de correction (= 0,3)}$$

L'efficacité moyenne de marquage est ainsi estimée à environ 2 fluorophores par molécule d'ARN.

2.5.3 Marquage radioactif d'ARN au ³²P

Avant d'être marqué en 5', l'ARN doit être déphosphorylé. Pour cela, 2 µg d'ARN sont mis à incuber pendant 40 min à 37°C en présence de 40 U de RNasine (*Promega*), 2,5 µl de tampon 10x (*Promega*) ainsi que 1U de phosphatase alcaline (*CIP, NEBiolabs*) dans un volume réactionnel de 25 µl. L'ARN est extrait par addition de 25 µl d'eau stérile et 50 µl de phénol, vortexé puis centrifugé 5 min à 16 000xg. La phase aqueuse est récupérée et l'ARN précipité, lavé et dissous dans 10 µl d'eau milliQ stérile.

Pour être marqué, 0,7 µg d'ARN déphosphorylé sont chauffés 1 min à 90°C, puis incubés 40 min à 37°C en présence de 40 U de RNasine (*Invitrogen*), 2 µl de tampon 10x (*Promega*), 10

U de T4 Polynucléotide kinase (*Promega*) ainsi que 3 μl de γ - ^{32}P -ATP (10 $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$; 3 000 Ci/mmmole) dans un volume réactionnel final de 20 μl . Après addition du **tampon de charge STOP**, l'ARN est mis à migrer sur gel de polyacrylamide 8%, 8M urée, TBE 1x à 250V, 20 mA. Le marquage est révélé par autoradiographie et l'ARN non dégradé est élué du gel sous agitation à 4°C durant la nuit dans du **tampon d'éluion** et 10% de phénol. Enfin l'ARN est précipité dans 3 volumes d'éthanol 100%, 1/10^e d'acétate de sodium 3M, lavé, dissous dans de l'eau milliQ stérile et stocké à -80°C.

Tampon de charge STOP : 98% (v/v) formamide ; 5 mM EDTA ; 0,02% bleu de xylène-cyanol ; 0,02% bleu de bromophénol

Tampon d'éluion : 0,5 M acétate de sodium; 10 mM acétate de magnésium; 0,1 mM EDTA; 0,1% SDS

2.6 Séparation des acides nucléiques

2.6.1 Electrophorèse sur gel d'agarose

Les molécules d'ADN peuvent être séparées en fonction de leur taille par migration électrophorétique sur gel d'agarose. L'ADN est chargé (1/3 de volume de **tampon de charge**) sur un gel d'agarose (entre 0.8% et 2% (p/v)) dans du **tampon TBE 1x**. La migration de l'ADN s'effectue sous une tension entre 100 et 150 V. Les fragments d'ADN sont ensuite visualisés sous UV grâce au bromure d'éthidium incorporé dans le gel (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) et s'intercalant au sein de l'ADN permettant sa visualisation sous UV. La position respective de chaque fragment sein du gel est déduite grâce à la présence d'un marqueur de poids moléculaire.

Tampon de charge : 30% (v/v) glycérol ; 0,25% (p/v) xylène cyanol ; 0,25% (p/v) bleu de bromophénol

Tampon TBE 1x : 45 mM Tris-borate ; 1 mM EDTA, pH 8,3

Marqueur de poids moléculaire : 1kb plus DNA Ladder (*Invitrogen*)

2.6.2 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions natives

Les produits de PCR servant de matrice à la transcription *in vitro* des ARN sont chargés dans 1/3 de volume de tampon de charge sur gel polyacrylamide 10% TAE 1x. La migration s'effectue dans le **tampon TAE 1x**. Les fragments d'ADN sont ensuite visualisés sous UV (GBox, *Syngene*) après avoir incubé le gel dans un bain de bromure d'éthidium à 1 µg/ml.

Tampon TAE 1x : 40 mM Tris-acétate pH 8 ; 1 mM EDTA

2.6.3 Electrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes

Les ARN sont séparés selon leur taille par migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Le gel (de concentration finale 8-15%) est préparé à partir d'une solution stock d'acrylamide/N,N'méthylène bisacrylamide (19/1) à 40% dans du **tampon TBE 1x** et 8 M d'urée. La polymérisation du gel est catalysée par l'addition d'APS (0,1% (p/v)) et de TEMED (0.035% (v/v)). Avant dépôt, les acides nucléiques sont additionnés d'un volume de **tampon de charge STOP** et chauffés à 95°C pendant 3 min puis conservés dans la glace avant dépôt. La migration s'effectue sous 250 V - 50 mA dans le tampon TBE 1x. Le bleu de bromophénol et le xylène cyanol constituent des témoins de migration. Les acides nucléiques sont ensuite visualisés par autoradiographie sur plaque phosphorimager et analysés en utilisant les programmes Typhoon TRIO et ImageQuantTL (*GE Healthcare*) s'ils sont marqués radioactivement, ou sous UV après coloration du gel dans un bain de bromure d'éthidium à 1 µg/mL (Gbox, *Syngene*).

Tampon de charge STOP : 98% (v/v) formamide ; 5 mM EDTA ; 0,02% bleu de xylène-cyanol ; 0,02%bleu de bromophénol

Tampon TBE 1X : 45 mM Tris-borate ; 1 mM EDTA, pH 8,3

2.7 Southern Blot

Après un éventuel traitement par des enzymes de restriction, les molécules d'ADN à analyser (produits de PCR, plasmides ou ADNmt) sont déposées sur gel d'agarose et séparées en fonction de leur taille par comme décrit **paragraphe II-2.6.1**

Après électrophorèse, le gel est plongé dans une **solution de dépurination** et mis sous agitation pendant 30 min, ce après quoi la solution est remplacée par une **solution de dénaturation**. La solution est renouvelée au bout de 5 min et le traitement poursuivi pendant 15 min. Enfin, le gel est plongé 2 fois 10 min dans une **solution de neutralisation**. Pendant ce temps, on découpe 2 feuilles de papier Whatman ainsi qu'un morceau de membrane HybondTM-N+ (*Amersham Pharmacia Biotech*) aux dimensions du gel que l'on immerge dans de l'eau milliQ stérile. Pour le montage du système de transfert, le gel est placé entre la membrane et le papier Whatman humidifiés et disposé sur une pile de papier filtre. Au sommet de cette construction, on ajoute un poids pour faire pression sur l'ensemble, le transfert sur membrane se faisant alors de manière passive pendant la nuit. Le lendemain, la membrane est fixée sous UV à une puissance de 120 000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ puis pré-hybridée à 65°C pendant 1h avant d'être hybridée pendant au moins 6h avec les ARN marqués au ³²P dans du PBS 1x à 37°C.

La membrane est lavée à 37°C avec du **tampon de lavage** puis exposée pendant 24h minimum sur une plaque Imaging Plate Fuji BASIII.

Les signaux correspondant à l'hybridation de la sonde au niveau des fragments ciblés sont révélés par le scanner Typhoon TRIO (*GE Healthcare*) et quantifiés par le programme ImageQuantTL (*GE Healthcare*).

Solution de dépurination : 0,25 N HCl

Solution de dénaturation : 1,5 M NaCl ; 0,5 M NaOH

Solution de neutralisation : 1,5 M NaCl ; 0,5 M Tris-HCl pH 8

Tampon de lavage : 2x SSC ; 0,1% SDS

2.8 Northern blot

Les ARN extraits des cellules (**paragraphe II-2.2**) sont dissous dans 10 µl d'eau milliQ stérile avant d'être déposés sur gel comme décrit **paragraphe II-2.6.3**. Avant transfert, le gel est coloré au bromure d'éthidium (1 µg/ml) pour observer le profil de migration des acides nucléiques sous UV (Gbox, Syngene). Le gel est ensuite transféré sur membrane HybondTM-N (GE Healthcare) par électrotransfert, le tout étant immergé dans du **tampon de transfert ARN** et soumis à un courant de 10 V, 200 mA à 4°C pendant la nuit.

Le lendemain, la membrane est séchée, fixée de chaque côté 3 min sous UV à une puissance de 150 000 µJ/cm² puis incubée à 65°C dans une **solution de pré-hybridation** qui sera remplacée après 2h par la **solution d'hybridation**. Après minimum 6h d'hybridation à une température variant selon la sonde utilisée, la membrane est lavée 2 fois pendant 15 min dans du **tampon de lavage** à température ambiante, scellée entre 2 films plastiques et exposée pendant 24h sur une plaque Imaging Plate Fuji BASIII. Les signaux correspondant aux différentes sondes marquées sont révélés par le scanner Typhoon TRIO (GE Healthcare) et quantifiés par le programme ImageQuantTL (GE Healthcare).

Une membrane peut être utilisée plusieurs fois mais pour cela, elle doit être lavée avec une **solution de déshybridation** pendant 30 min à 80°C.

Dans le cas où l'on souhaiterait calculer l'efficacité d'import d'un ARN dans les mitochondries, 3 sondes sont utilisées (**Tableau 9**). La première cible un ARN cytosolique et permet de vérifier le degré de pureté de la préparation mitochondriale et de déterminer s'il y a contamination de la fraction mitochondriale. La seconde est dirigée contre un ARN mitochondrial et la dernière est spécifique de l'ARN à tester. Cette dernière comparée à l'hybridation avec la sonde mitochondriale permet de calculer l'efficacité d'import de l'ARN recombinant au sein des mitochondries selon la formule suivante :

$$\frac{[[\text{ARN}]_M / [\text{ARNt mito}]_M]}{[[\text{ARN}]_T / [\text{ARNt mito}]_T]} \text{ où}$$

$[\text{ARN}]_M$ est la quantité d'ARN recombinant présent dans la fraction mitochondriale

$[\text{ARN}]_T$ est la quantité d'ARN recombinant présent dans la fraction totale

$[\text{ARNt mito}]_M$ est la quantité d'ARNt mitochondrial présent dans la fraction mitochondriale

$[ARNt\ mito]_{T=}$ est la quantité d'ARNt mitochondrial présent dans la fraction totale

Tampon de transfert ARN : 1 M NaH_2PO_4 ; 1 M Na_2HPO_4

Solution de pré-hybridation : 6x SSC ; solution de Denhardt 10x ; 0,2% SDS (v/v)

Solution de Denhardt 100x : 20 g/l ficoll ; 20 g/l polyvinyl-pyrrolidone ; 2% BSA

Solution d'hybridation : 1 volume de solution de pré-hybridation, 1 volume de sonde radiomarquée dans NaCl 1M

SSC 1X : NaCl 0,15M ; Trisodium citrate 0,015M ; NaOH qsp pH 7

Tampon de lavage : 2x SSC ; 0,1% SDS

Solution de déshybridation : 0,02x SSC ; 0,1% SDS

Les différentes sondes utilisées sont répertoriées dans le **Tableau 9** suivant :

Sonde	Séquence	Température d'hybridation
anti - TRK1 (1-34)	5'- GAG TCA TAC GCG CTA CCG ATT GCG CCA ACA AGG C -3'	45°C
anti - ARNr 5,8S	5'- GGC CGC AAG TGC GTT CGA AG -3'	45°C
anti - ARNr 5S	5'- CAT CCA AGT ACT ACC AGG CCC -3'	45°C
anti - ARNt ^{Lys} (cyto)	5'- ACT TGA ACC CTG GAC C -3'	45°C
anti - ARNt ^{Leu} (mito)	5'- GAA CCT CTG ACT GTA AAG -3'	45°C
anti - ARNt ^{Thr} (mito)	5'- TCT CCG GTT TAC AAG AC -3'	45°C

Tableau 9 : Séquence et température d'hybridation des sondes utilisées pour le Northern Blot

2.9 Analyse des intermédiaires de la réplication par électrophorèse bidimensionnelle

2.9.1 Isolation et purification d'ADNmt à partir de cellules en culture

Pour effectuer cette analyse, la première étape consiste à purifier l'ADNmt. Pour cela, nous appliquons une technique d'extraction un peu différente de celle généralement utilisée et présentée **paragraphe II-2.1** en suivant le protocole qui nous a été généreusement fourni par le Dr Ian Holt. Nous partons donc de cellules (1 500 cm²) cultivées jusqu'à atteindre une confluence d'environ 80-90%. Les cellules sont détachées selon la technique habituelle, lavées au PBS 1x et re-suspendues dans 9 volumes de **tampon hypotonique** et conservées dans la glace pendant 10 min. A partir de ce point, l'ensemble des étapes à venir doivent être effectuées en conservant l'échantillon dans la glace. Les cellules sont cassées de manière mécanique une vingtaine de fois à l'aide d'un

homogénéiseur de Dounce muni d'un piston ultra-fin. Le lysat ainsi obtenu est immédiatement additionné de 2 ml de **tampon MSH 2,5x** par 3 ml de tampon hypotonique et centrifugé 10 min à 1 600xg et 4°C. Le surnageant est ensuite récupéré et à nouveau centrifugé 10 min et ce 2 fois de suite puis une fois de plus à 10 000xg pendant 10 min. On récupère le culot ainsi obtenu et on le resuspend dans 10 ml de tampon DNase 1x (**tampon DNase I 10x** dilué dans du tampon MSH 1x) avant d'ajouter 200 U de DNase I (*Boehringer Mannheim*) et de placer le tube sur roue à 4°C pendant 15 min. Une fois cette durée écoulée, on ajoute de l'EDTA à concentration finale de 15 mM, ce qui permet de stopper l'activité de la DNase, et on centrifuge 10 min à 10 000xg. On ôte le surnageant et lave le culot avec 5 ml de tampon **MSH 1x sans BSA** et on répète à nouveau cette étape de lavage. Après cela, on reprend le culot obtenu dans ½ volume de tampon MSH 1x sans BSA, on charge l'échantillon sur une **bicouche de sucrose 1,5-1 M** et on centrifuge 1h à 16 000xg pendant 1h. A l'issue de cette centrifugation, les mitochondries doivent former une bande nette à l'interphase entre les couches à 1 M et 1,5 M. Afin de récupérer l'échantillon, on ôte le maximum du gradient se trouvant au-dessus de la bande de mitochondries et on transfère l'échantillon dans un tube propre. L'échantillon est ensuite dilué dans du **tampon de gradient** de manière à ce que l'on atteigne une concentration en sucrose de 250 mM, ainsi on pourra culotter correctement les mitochondries sans que celles-ci n'explorent. On centrifuge ensuite cette suspension 10 min à 16 000xg puis les mitochondries sont re-suspendues dans 2 ml de **tampon de lyse** additionnés de 20 µl de protéinase K (20 mg/ml) (*Promega*) et on incube dans la glace. Au bout de 30 min, on y ajoute 20 µl de sarkosyl 20% puis s'en suit une phase d'extraction au phénol et une avec un mélange chloroforme : alcool isoamylique (rapport 24 :1). 700 µl de la phase aqueuse sont transférés dans un nouveau tube auxquels on ajoute 100 mM NaCl et un volume d'isopropanol. A partir de là, l'échantillon peut être conservé à -20°C ou être utilisé immédiatement pour la suite du traitement.

Tampon hypotonique : 20 mM HEPES pH 7,8 ; 5 mM KCl ; 1,5 mM MgCl₂ ; 2 mM DTT ; 1 mM PMSF ; 1 mg/ml BSA ; 1/50 (v/v) inhibiteur de protéase (*Roche*)

Tampon MSH 2,5x : 525 mM mannitol ; 175 mM sucrose ; 20 mM HEPES pH 7,8 ; 5 mM EDTA ; 2 mM DTT ; 1 mM PMSF ; 1 mg/ml BSA ; 1/50 (v/v) inhibiteur de protéase (*Roche*)

Tampon MSH 1x : 210 mM mannitol ; 70 mM sucrose ; 20 mM HEPES pH 7,8 ; 2 mM EDTA ; 2 mM DTT ; 1 mM PMSF ; 1 mg/ml BSA ; 1/50 (v/v) inhibiteur de protéase (*Roche*)

Tampon DNase I 10x : 100 mM Tris pH 7,8 ; 25 mM MgCl₂ ; 5 mM CaCl₂

Bicouche de sucrose : gradient 1,5-1 M dans 10 mM HEPES pH 7,8 ; 5 mM EDTA ; 2 mM DTT

Tampon de gradient : 10 mM HEPES pH 7,8 ; 5 mM EDTA ; 2 mM DTT

Tampon de lyse : 20 mM HEPES pH 7,8 ; 75 mM NaCl ; 50 mM EDTA

2.9.2 Digestion d'ADNmt par les enzymes de restriction

Dans le but de sonder au mieux l'ADNmt, celui-ci peut être traité avec différentes enzymes de restriction. Dans le cas qui nous occupe, 2 µg d'ADNmt ont été digéré avec une enzyme *BlnI* FastDigest (*Thermo Scientific*) (GC/TNAGC) à 37°C selon les recommandations du fournisseur. Les coordonnées nucléotidiques des sites de coupure ainsi que la taille des fragments générés pour l'ADNmt sauvage et muté sont renseignées dans le **Tableau 10**.

Cordonnées sites de coupure	Taille des fragments ADNmt WT (pb)	Taille des fragments ADNmt muté (pb)
788 - 1 093	306	306
1 094 - 1 248	155	155
1 249 - 4 533	3 285	3 285
4 534 - 5 646	1 113	1 113
5 647 - 5 699	53	53
5 700 - 787	11 657	4 583

Tableau 10 : Coordonnées nucléotidiques des sites de coupure et tailles des fragments générés pour l'ADNmt sauvage (WT) et muté

Après digestion, l'échantillon est phénolisé, précipité et lavé avant d'être repris dans de l'eau stérile milliQ pour la suite du traitement

2.9.3 Electrophorèse bidimensionnelle

Lors de cette étape les fragments d'ADNmt préalablement digérés sont séparés sur la base de leur masse (1^{ère} dimension) puis en fonction de leur volume hydrodynamique, c'est-à-dire la combinaison de leur masse et de leur volume (2^{ème} dimension) ([Reyes et al., 2007](#)).

Pour ce faire, la première migration est réalisée à température ambiante dans un gel d'agarose TBE 1x 0,5% et ce à raison de 0,7 V/cm pendant 24h. Point important, il faut s'assurer que le gel et le support utilisé pour le couler soient dépourvus de bromure

d'éthidium. Notons que plusieurs pistes peuvent être chargées avec une échelle de poids moléculaire et découpées à l'aide d'une lame de scalpel au cours de la migration pour connaître la localisation des fragments. Le lendemain, les pistes à analyser sont excisées, tournées d'un angle de 90° dans les sens inverse des aiguilles d'une montre et placées dans une nouvelle cuve de migration. Les bandes sont incluses dans un gel de plus haute réticulation (gel 1% agarose TBE 1x) contenant du bromure d'éthidium à raison de 500 ng/ml. Cette seconde migration s'effectue à 4°C dans un bain de TBE 1x froid contenant 500 ng/ml de bromure d'éthidium et sous une tension de 6 V/cm pendant 20h. Le système est associé à une pompe péristaltique assurant la circulation du tampon de la cathode vers l'anode.

2.9.4 Transfert de type Southern et hybridation

Après électrophorèse dans la seconde dimension, le gel est transféré sur une Hybond™-N+ (*Amersham Pharmacia Biotech*) comme décrit **paragraphe II-2.7**. Seule petite différence, le tampon de pré-hybridation dont la composition est présentée ci-dessous.

Tampon de pré-hybridation : 0,25 M Na₃PO₄ pH 7,2 ; 7% SDS

La membrane est ensuite mise en présence d'une sonde marquée à l'aide du kit Prime-a-Gene® Labeling System (*Promega*). La sonde utilisée est un fragment de PCR issu de l'amplification d'une région de l'ADNmt (nucléotides 8 099 - 8 365 à 15438 – 15 931) par les amorces présentées **Tableau 11**. Pour cela, 25 ng de ce fragment de PCR sont chauffés 2 min à 95°C avant que l'on y ajoute : 10 µl de tampon 5x, 2 µl d'un mix de dNTP (sauf dCTP), 2 µl de BSA nucléase free, 5 unités de DNA pol I à 0,1U/µl, 5 µl de α-[³²P]-dCTP (50 µCi/ µl ; 3 000 Ci/mmmole) et de l'eau milliQ stérile qsp 50 µl. Le milieu réactionnel est incubé 1h à température ambiante puis 2 min à 95°C. Après cela, on ajoute 2 µl d'EDTA 0,5 M, puis on met en présence de la membrane à 65°C pendant la nuit.

Après cela, la membrane est lavée à 65°C avec du tampon 1x SSC, 0,1% SDS et est exposée pendant 24h minimum sur une plaque Imaging Plate Fuji BASIII.

Les signaux correspondant à l'hybridation de la sonde au niveau des fragments ciblés sont révélés par le scanner Typhoon TRIO (*GE Healthcare*) et quantifiés par le programme ImageQuantTL (*GE Healthcare*).

	Séquence	Longueur (nt)	Température annealing
Amorce F	5'- TAC TAC AAG CTT ACA GAT GCA ATT CCC GGA CG -3'	32	72,5°C
Amorce R	5'- TCT TTG GAA TTC GTT TGG ATA TAT GGA GGA TGG -3'	33	70°C

Tableau 11 : Caractéristiques des amorces servant à l'amplification de la sonde utilisée pour l'électrophorèse bidimensionnelle

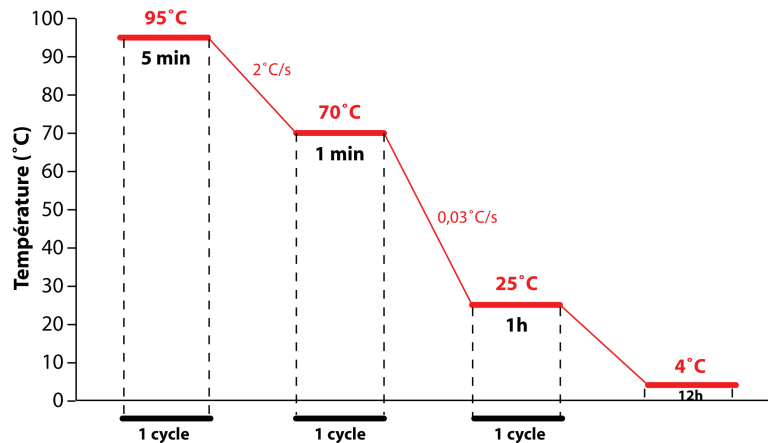
2.10 Visualisation des arrêts dans la réplication par LM-PCR

Une technique complémentaire à l'analyse des intermédiaires de réplication par électrophorèse bidimensionnelle est la LM-PCR (pour Ligation Mediated PCR) qui permet de localiser les sites d'arrêt de la réplication au sein de l'ADNmt. Via cette méthode, on peut ainsi cartographier les sites de l'ADNmt où apparaissent des régions simple brin et ce au nucléotide près, et ainsi de déterminer les sites où la réplication a été stoppée. Pour procéder, nous devons disposer d'ADNmt purifié selon la méthode présentée au **paragraphe II-2.9.1.**

2.10.1 Synthèse du premier brin

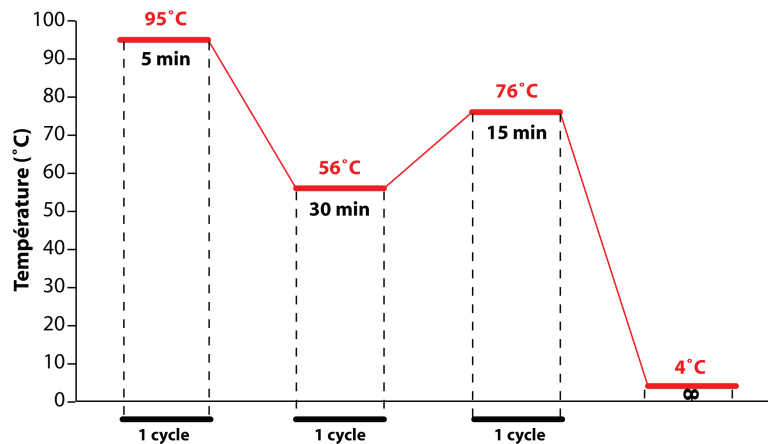
Pour cette première étape, le milieu réactionnel est composé comme suit : 100 ng d'ADNmt, 6 µl de **tampon premier brin 5x**, 3 µl de primer N1 (0,1 µM) (**Tableau 12**), 2,4 µl de dNTP (2,5 mM), 0,25 µl de polymérase (2 U/µl) et de l'eau milliQ stérile qsp 30 µl. Il faut noter que le primer N1 doit être situé à une distance de l'extrémité 5' libre comprise entre 300 et 1 000 nucléotides et que sa température d'annealing doit être au moins de 56°C. Le milieu réactionnel est ensuite soumis à 1 cycle d'extension du primer dans un thermocycleur de type Mastercycler pro (*Eppendorf*) selon les conditions présentées ci-dessous.

Tampon premier brin 5x : 200 mM NaCl ; 50 mM Tris-HCl pH 8,9 ; 25 mM MgSO₄ ; 0,05% gélatine



2.10.2 Création du linker universel et ligation

Dans le but de pouvoir reconnaître l'extrémité 5' quelle que soit sa séquence nous devons lui associer un linker universel. Pour obtenir 500 µl de ce linker, nous préparons un milieu réactionnel avec 100 µl d'oligonucléotide LMPCR 1 (100 µM), 100 µl d'oligonucléotide LMPCR 2 (100 µM) (**Tableau 12**), 125 µl de Tris-HCl pH 8 (1M) et de l'eau milliQ stérile qsp 500 µl. La réaction se déroule selon les conditions résumées ci-dessous.



Après annealing, les échantillons peuvent être aliquotés et conservés à -20°C . Une fois en possession de ce linker, nous ajoutons 30 µl du produit réactionnel synthétisé lors de l'étape présentée **paragraphe II-2.10.1.**, 7,5 µl de tampon ligase 10x, 10 µl de linker (20 µM), 1 µl de T4 DNA ligase (*New England Biolabs*) et de l'eau milliQ stérile qsp 75 µl. Le milieu réactionnel est incubé à 16°C pendant la nuit. Le lendemain, le produit de ligation est additionné de 8,4 µl d'acétate de sodium 3M pH 5,2, 5 µl de glycogène (10 mg/ml) et 220 µl d'éthanol absolu puis mis à -20°C dans de la carboglace pendant 1h. Une fois ce laps de temps écoulé, les

échantillons sont centrifugés 20 min à 16 000xg à 4°C, lavés, séchés et le culot repris dans 50 µl d'eau milliQ stérile.

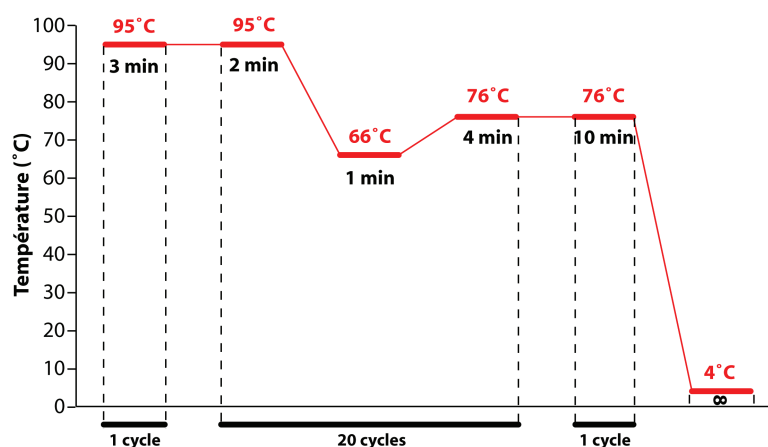
	Séquence	Longueur (nt)	Température annealing
LMPCR1	5'- GCG GTG ACC CGG GAG ATC TGT ATT C -3'	25	57,5°C
LMPCR2	5'- GAA TAC AGA TC -3'	11	30°C

Tableau 12 : Caractéristiques des primers servant à la création du linker universel

2.10.3 Amplification classique par PCR

Lors de cette étape, nous réalisons une PCR classique, le milieu réactionnel étant composé de 50 µl du produit de ligation, 20 µl de **tampon d'amplification 5x**, 1 µl de primer N2 (10 µM) (**Tableau 13**), 1 µl de primer LMPCR 1 (10 µM), 8 µl de dNTP (2,5 mM), 0,5 µl de polymérase Vent (2 U/µl) (*New England Biolabs*) et d'eau milliQ stérile qsp 100 µl. Pour cette étape, le primer N2 est un primer niché du primer N1 et partage habituellement avec celui-ci 3 à 5 nucléotides. Sa température d'annealing doit être supérieure à celle du primer N1 et d'au moins de 58°C. Notons que la température d'annealing du primer LMPCR 1 est de 72°C. Le milieu réactionnel est ensuite amplifié par PCR selon les conditions présentées ci-dessous. Notons qu'à l'issue de cette étape, il est possible de conserver le produit de PCR à -20°C et que ceci n'influe en rien sur le résultat obtenu par rapport à un échantillon frais.

Tampon d'amplification 5x : 200 mM NaCl ; 100 mM Tris-HCl pH 8,9 ; 25 mM MgSO₄ ; 0,05% gélatine ; 0,05% Triton X-100



13 339... ..TTCAAAGCCATACTATTATGTGCTCCGGGTCCATCCACAACCTTAACAATGAACAAGATATTCGAAAAATAGGAGGACTACTCAAACC
 ATACCTCTCACTTCAACCTCCCTACCATTTGGCAGCCTAGCATTAGCAGGAATACCTTCTCACAGGTTTCTACTCCAAGACCACATCATCG
 AAACCGCAAACATATCATAACAACGCCTGAGCCCTATCTATCTCTCATCGTACTCTCTGACAAGCGCCTATAGCACTCGAATAATTCTTC
 TCACCCTAACAGGTCAACCTCGCTCCCCACCCCTTACTAACATTAACGAAAATAACCCCACTTACTAAACCCCATTAACGCTGCGAGCCGG
 AAGCCTATTCGCAGGATTTCTCATTACTAACAAATTTCCCCCGCATCCCTTCCAACAACAATCCCTCTACTAAAACTCACAGCCTCG
 CTGTCACTTCTAGGACTTCTAACAGCCCTAGACCTCAAC... ..13 851

	Séquence	Longueur (nt)	Température annealing	Distance mutation (pb)	Distance site contrôle (pb)
N1	5'- GCT GTG AGT TTT AGG TAG AGG -3'	21	62°C	292	381
N2	5'- GGG GGA TTG TTG TTT GGA AGG G -3'	22	68°C	273	362
N3	5'- CCT GCG AAT AGG CTT CCG GCT GC -3'	23	76°C	217	306
N4	5'- GGC GTT TAA TGG GGT TTA GTA GGG -3'	24	72°C	192	281
N5	5'- GGG TGG GGA AGC GAG GTT GACC -3'	22	74°C	141	230
N6	5'- CCT GAC AAG CGC CTA TAG CAC TCG -3'	24	76°C	97	186
N7	5'- GAG CCC TAT CTA TTA CTC TCA TCG C -3'	25	74°C	65	154

Site contrôle BpII : 5'- AAAACCATACCTC -3' (distance mutation 89 pb)

Position mutation ponctuelle A13514G

CC Chevauchement de base

Tableau 13 : Caractéristiques des primers utilisés pour la LM-PCR

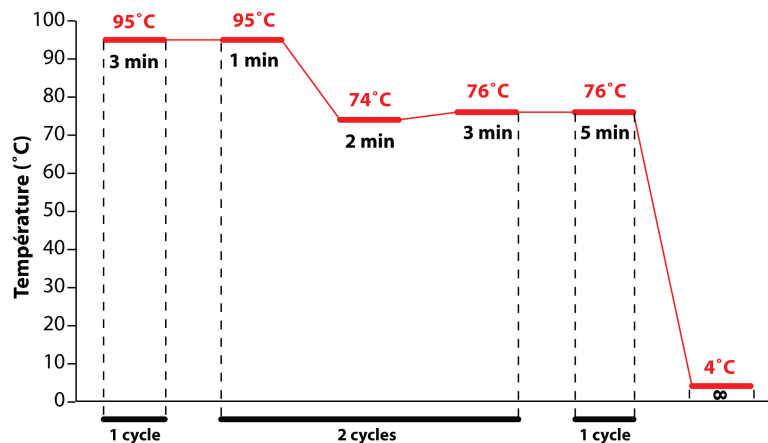
Les différents primers utilisés lors de la LM-PCR sont répertoriés dans ce tableau et indiqués en couleur : N1 (rouge), N2 (bleu), N3 (vert), N4 (violet), N5 (orange), N6 (rose) et N7 (jaune). La séquence de la zone ciblée et la localisation des primers est indiquée au-dessus en suivant le même code couleur.

2.10.4 Marquage des oligonucléotides internes

Les oligonucléotides internes (primers N3-N7 - **Tableau 13**) sont marqués au niveau de leur extrémité 5'. Pour cela on ajoute à 1,5 µl (10 µM) de primer : 1 µl de tampon 10x, 1 µl de T4 polynucléotide kinase (10 U/µl), 3 µl de γ -[³²P]-ATP (10 µCi/ µl ; 3 000 Ci/mmmole) et de l'eau milliQ stérile qsp 10 µl. Le mélange est mis 40 min à 37°C puis l'enzyme inactivée 2 min à 90°C. On complète le milieu en y ajoutant de l'eau milliQ stérile qsp 100 µl. Ensuite, on détermine le taux d'incorporation de γ -[³²P]-ATP dans les oligonucléotides. 4 µl de primer interne marqué sont additionnés de 12 µl d'eau milliQ stérile et 3 µl de ce mélange déposés sur un morceau de membrane HybondTM-N+ (*Amersham Pharmacia Biotech*) et ce en 4 exemplaires par primer. Après dépôt 2 papiers sont séchés et lavés 2 fois de suite dans du tampon PBS 1x pH 6,8 puis séchés à nouveau. Les 2 autres papiers non lavés nous serviront pour estimer le nombre de cpm total. L'ensemble des échantillons sont déposés dans une fiole de comptage où l'on ajoute 5 ml de liquide Ecoscint O (*National Diagnostics*). Le taux d'incorporation est mesuré à l'aide d'un compteur à scintillations de type LS 6 500 (*Beckman Coulter*).

2.10.5 Primer extension

Pour cette étape on prépare un milieu réactionnel composé comme suit : 50 μl d'ADN, 10 μl de tampon d'amplification 5x, 5 μl de primer interne marqué (0,6 μM), 0,5 μl de primer LMPCR 1 (10 μM), 4 μl de dNTP (2,5 mM), 0,5 μl de polymérase (2 U/ μl), et de l'eau milliQ stérile qsp 100 μl . Le primer interne doit se situer à une distance d'environ 100 nucléotides de l'extrémité 5' attendue et posséder une température d'annealing supérieure à celle du primer N2 et d'au moins 60°C. Puisque la position de l'extrémité 5' attendue ne peut pas être localisée avec précision, plusieurs primers doivent être marqués, certains fonctionnant mieux que d'autres. Après avoir préparé le milieu, la réaction est effectuée selon les conditions suivantes.



Après amplification, on procède à l'extraction avec 100 μl d'un mélange phénol : chloroforme (rapport 25 : 24) puis les échantillons sont précipités, lavés et re-suspendus dans 10 μl de **tampon TE** auxquels on ajoute 10 μl de **tampon de charge**. Après les avoir chauffés 10 min à 90°C, les échantillons sont déposés sur gel de polyacrylamide 8%, 8M urée, TBE 1x. La migration s'effectue 2h30 à 500 V puis 3h à 600 V. Le gel est ensuite fixé, séché 2h30 à 75°C puis exposé pendant 24h minimum sur une plaque Imaging Plate Fuji BASIII. Les signaux sont révélés par le scanner Typhoon TRIO (*GE Healthcare*) et quantifiés par le programme ImageQuantTL (*GE Healthcare*).

Tampon TE : 10 mM Tris-HCl ; 1 mM EDTA

Tampon de charge : 98% (v/v) formamide ; 10 mM EDTA ; 0,1% bleu de xylène-cyanol ; 0,1% bleu de bromophénol

2.11 Analyse de l'import des ARN recombinants par microscopie confocale

Dans le but de suivre *in vivo* l'import des ARN recombinants au sein des mitochondries, des cellules cybrides ont été transfectées avec de l'ARN marqué à l'aide d'un fluorophore (**voir paragraphe II-2.5.2**) à raison de 1 µg/10cm². Les cellules cultivées dans des chambres de culture (2 cm²) de plaques Lab-Tek® (*Nunc*) sont colorées avec 5 µM de TMRM (Tétraméthylrhodamine Methyl Ester) pendant 15 min à 37°C, lavées au PBS et observées dans du DMEM dépourvu de rouge phénol. Le suivi de l'import a été assuré à l'aide d'un microscope confocal de type LSM 700 (*Zeiss*) muni d'un objectif à immersion à huile 63x/1,40 et du logiciel d'acquisition associé ZEN (*Zeiss*) toutes les 24h et ce pendant 4 jours après la transfection. Les longueurs d'onde d'excitation sont de 488 nm (canal vert) et 555 nm (canal rouge). Les images ont été analysées avec le logiciel ImageJ ([Schneider et al., 2012](#)) à l'aide du plugin d'analyse de co-localisation JACoP ([Bolte and Cordelieres, 2006](#)).

3. Techniques relatives à l'étude des protéines

3.1 Dosage protéique par la Méthode de Bradford

La mesure de la concentration protéique par la méthode de Bradford consiste en un dosage colorimétrique basé sur un changement d'absorbance mesuré à 595 nm. Pour cela, 2 µl de la suspension protéique à analyser sont additionnés de 50 µl de NaOH 6%, 200 µl de réactif de Bradford (*Bio-Rad*) et d'eau milliQ stérile qsp 1 ml. L'échantillon est vortexé puis laissé à température ambiante pendant 5 min. La mesure de l'absorbance est effectuée à longueur d'onde fixe (595 nm) grâce à un spectrophotomètre DU® 730 (*Beckman Coulter*) et la concentration protéique en est déduite en se rapportant à une courbe étalon pré-établie.

3.2 Western blot

Pour la détection protéique, un culot sec de 4 cm² de cellules est solubilisé dans 20 µl de PBS et la concentration protéique est mesurée comme indiqué dans le paragraphe précédent. Un volume de **tampon de Laemmli** est ajouté dans le but d'avoir un ratio SDS : protéine d'environ 25-30 (p/p). Les échantillons sont soniqués dans le but de fragmenter

l'ADN cellulaire par pulse de 10s avec un sonicateur de type VibraCell 72408 (*Bioblock Scientific*) jusqu'à ce que l'échantillon ne soit plus visqueux. Les échantillons sont chauffés 3 min à 40°C puis déposés sur gel protéique SDS-PAGE 12%. La migration s'effectue pendant 1h à 150 V – 50 mA puis les échantillons sont transférés sur membrane de nitrocellulose (*GE Healthcare*).

Le transfert est effectué pendant 1h à 4°C dans du **tampon de transfert protéines** sous 200 mA – 100 V. Après transfert, la membrane est colorée au rouge Ponceau. Avant d'être mise en présence des anticorps, la membrane doit d'abord être incubée sous agitation dans une **solution de blocage** et ce 1h à température ambiante, ceci ayant pour but de diminuer les hybridations aspécifiques. Après cette étape, la membrane est rincée avec du **tampon PBS-Tween**, puis incubée avec les anticorps primaires (1 : 1 000), le tout à 4°C sous agitation pendant la nuit (ou le cas échéant 1h à température ambiante). Les anticorps primaires utilisés lors de cette étude sont dirigés contre la porine et la protéine ND5 (*abcam*). Le lendemain, la membrane est rincée 3 fois 10 min au PBS-Tween avant d'être mise en présence des anticorps secondaires (*GE Healthcare*) dilués (1 : 10 000) dans du PBS-Tween pendant 1h à température ambiante. La membrane est à nouveau rincée 3 fois 10 min dans du PBS-Tween puis on la laisse sécher. Pour la révélation, les complexes protéines/anticorps sont détectés en immergeant 5 minutes la membrane dans une **solution de révélation**. Cette solution est préparée extemporanément en mélangeant 10 ml de Tris-HCl ; 3 µl d'H₂O₂ ; 50 µl de luminol et 25 µl d'acide coumarique. Les signaux sont révélés grâce au programme d'acquisition GeneSnap de la GBox (*Syngene*) et quantifiés avec le programme GeneTools (*Syngene*).

Tampon de Laemmli : 150 mM Tris pH 8 ; 10 mM EDTA ; 2% SDS (v/v) ; 10% glycérol (v/v)

Tampon de transfert protéines : Tris-Glycine-SDS 1x ; 20% éthanol

Tampon PBS-Tween : PBS 1x ; Tween 0,1%

Solution de blocage : Tampon PBS-Tween + 5% lait

Solution de révélation : 100 mM Tris-HCl pH 8,5 ; 30% H₂O₂ ; 90 mM acide coumarique (dans DMSO) ; 250 mM luminol (dans DMSO)

3.3 Détermination de l'interaction ADN/protéine par expérience de retard sur gel

Pour cette expérience de retard sur gel (ou **EMSA** pour **E**lectrophoretic **M**obility **S**hift **A**ssay), nous suivons le protocole décrit dans (Fernandez-Silva et al., 1996) et partons d'un culot de mitochondries issu de 25 cm² de cellules. Le culot est lavé avec 300 µl de **tampon de suspension** et centrifugé 1 min à 16 000xg et ce 2 fois de suite avant d'être resuspendu dans 1 volume de **tampon de lyse** auquel on ajoute extemporanément du Tween 20 (à raison de 0,5% en concentration finale) et du KCl (0,5 M en concentration finale). Les mitochondries sont ensuite lysées par pipettage jusqu'à obtention d'une suspension claire qui est passée au vortex à forte puissance pendant 30s. Le lysat est ensuite incubé 5 min dans la glace, vortexé à nouveau 30s et remis à nouveau 5 minutes dans la glace avant d'être centrifugé 45 min à 16 000 rpm et 4°C. Après cette étape, on collecte le surnageant en évitant de prélever la couche d'aspect cotonneux et la concentration de l'échantillon est mesurée au spectrophotomètre par la technique de dosage de Bradford (**voir paragraphe II-3.1**). Si les échantillons ne sont pas utilisés immédiatement, ils peuvent être conservés à -80°C.

Après cela, vient l'étape à proprement parler de retard sur gel. Pour ce faire, un gel de polyacrylamide 6% ; glycérol 5% ; TBE 1x est préparé et mis sous tension (180V ; 20 mA) à vide dans du TBE 0,5x pendant 1h à 4°C. Pendant ce temps on prépare le milieu réactionnel qui se compose comme suit : 0,2 pmol d'ADN marqué au ³²P ; 100 mM final de KCl ; 5 µg de BSA ; 5 µg d'ARNt d'E. Coli (servant de compétiteur non spécifique) ; 5 µg du lysat mitochondrial et du **tampon de liaison** qsp 20 µl (en s'assurant qu'il représente au moins 10 µl du volume réactionnel total). L'ADN marqué comme indiqué au **paragraphe II-2.5.3** est un fragment d'ADN amplifié par PCR au niveau de la région codant pour le gène de l'ARNt^{Leu}. Les amorces servant à obtenir ce fragment sont indiquées dans le **Tableau 14**. Le milieu est incubé 20 min à température ambiante avant d'être mis dans la glace et que l'on y ajoute 5 µl de glycérol 30%. Après avoir bien mélangé l'échantillon, celui-ci est déposé sur le gel et l'on fait migrer à 100 V – 20 mA pendant 1h, ce après quoi on augmente l'intensité à 200 V – 20 mA et qu'on laisse migrer jusqu'à ce que le bleu de bromophénol atteigne le bas du gel. Le gel est ensuite plongé dans une **solution de fixation** pendant 10 min puis séché sous-vide sur un papier Whatman 1h à 80°C. Le résultat est ensuite visualisé par autoradiographie sur plaque phosphorimager et analysés en utilisant les programmes Typhoon TRIO et ImageQuantTL (GE Healthcare).

Tampon de suspension : 10 mM Tris-HCl pH 6,7 ; 0,25 mM sucrose ; 0,15 mM MgCl₂

Tampon de lyse : 25 mM HEPES-KOH pH 7,6 ; 5 mM MgCl₂ ; 0,5 mM EDTA ; 1 mM DTT ; 1 mM PMSF ; 10% glycérol (v/v)

Tampon de liaison : 25 mM HEPES-KOH pH 7,6 ; 12,5 mM MgCl₂ ; 1 mM DTT ; 20% glycérol (v/v) ; 0,1% Tween (v/v)

Solution de fixation : 10% acide acétique (v/v) ; 10% éthanol (v/v)

Oligonucléotides	Séquence	Longueur (nt)	Température annealing	Conditions PCR
Primer hmt Leu UUR RT-dir	5'- GTT AAG ATG GCA GAG CC- 3'	17	52°C	95°C : 10 min 95°C : 30s 48°C : 30s 72°C : 1 min 72°C : 10 min x 30 cycles
Primer hmt Leu UUR RT-anti	5'- GTG TTA AGA AGA GGA ATT G -3'	19	52°C	

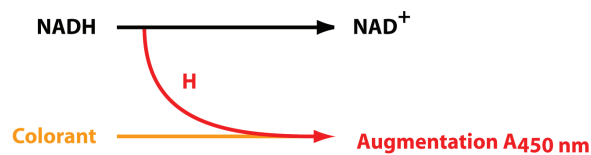
Tableau 14 : Caractéristiques des amorces servant à l'amplification du fragment d'ADN utilisé lors de l'expérience de retard sur gel

3.4 Test de traduction

Pour estimer le niveau de traduction mitochondriale *in vivo*, 10 cm² de cellules adhérentes sont lavées au PBS 1x puis cultivés pendant 15 min à 37°C en présence de DMEM contenant 100 µg/ml d'émétine qui a pour rôle de bloquer la sous-unité 40S du ribosome et donc la traduction cytoplasmique. 10 µl de [³⁵S]-méthionine (200 µCi/ ml ; 1175 Ci/mmol) sont ensuite ajoutés et les cellules replacées à 37°C pendant 30 min. Le milieu est ensuite remplacé par 500 µl de DMEM pendant 10 min pour chasser le surplus de [³⁵S]-méthionine non incorporée puis les cellules sont lavées, décollées, centrifugées et le culot repris dans 50 µl de PBS 1x. Pour l'analyse, 7 µg de protéines (la quantité ayant été déterminée au préalable par Western blot) sont déposées sur gel protéique SDS-PAGE 12% comme décrit dans le **paragraphe §II-3.2**). La visualisation et la quantification du niveau de traduction sont obtenues par autoradiographie sur plaque phosphorimager en utilisant les programmes Typhoon TRIO et ImageQuantTL (GE Healthcare).

3.5 Mesure de l'activité du complexe I

Cette analyse enzymatique permet de déterminer le niveau d'activité du complexe I en mesurant le niveau d'oxydation du NADH en NAD⁺. Cette réaction va alors induire la réduction d'un substrat coloré qui va mener à l'augmentation de l'absorbance à 450 nm.



Pour procéder à cette mesure, nous disposons d'un kit d'analyse MitoSciences[®] (Abcam) et suivons les instructions du fournisseur. Nous partons d'un culot de cellules de 2 cm² dont on va mesurer la concentration protéique qui est ensuite ajustée à 5,5 mg/ml dans du PBS 1x. On ajoute 1/10^{ème} de volume de détergent à l'échantillon (amenant ainsi sa concentration à 5 mg/ml) puis on incube l'échantillon dans la glace. Après 30 min d'incubation, on centrifuge 20 min à 16 000xg à 4°C puis on collecte le surnageant que l'on dilue à l'aide du tampon d'incubation fourni à la concentration souhaitée dans une gamme allant de 25 à 250 µg. l'échantillon est réparti dans la microplaque à raison de 200 µl/puit. Cette plaque faisant également partie du kit, est recouverte d'anticorps spécifiques de l'enzyme assurant la réaction mentionnée plus haut. Elle est recouverte d'un parafilm et mis à incuber sous agitation pendant 3h à température ambiante.

Une fois ce délai écoulé, la plaque est retournée et les puits vidés d'un coup sec avant d'être lavés à 3 reprises avec 300 µl du tampon 1x fourni. Pour la mesure, on ajoute dans chaque puit, 200 µl de la solution d'analyse (préparée comme indiqué par le fournisseur) en essayant d'éviter la formation de bulles. La mesure est effectuée à 450 nm toutes les 30 secondes pendant 3h à l'aide d'un lecteur de plaques de type VICTOR[™]X3 (Perkin Elmer). L'acquisition est faite à l'aide des logiciels WorkOut 2.5 et Perkin Elmer 2030 WorkStation.

3.6 Mesure de la consommation d'oxygène

L'ensemble des expériences portant sur la mesure de la consommation d'oxygène ont été effectuées en collaboration avec le Dr Mikhail Vvysokikh. Pour effectuer ces mesures, nous disposons au laboratoire d'un oxygraphe (*Hansatech instruments*) qui nous permet de déterminer le niveau de respiration des mitochondries en mesurant la quantité d'oxygène consommée.

Pour un test, nous devons disposer d'au moins 1 million de cellules (soit environ 25 cm²) resuspendues dans 1 ml de DMEM. Les cellules sont ensuite perméabilisées par une solution de digitonine à 10 mg/ml (*Sigma*) préparée le jour même et directement ajoutée dans la chambre de mesure à raison de 100 µg/mg de protéines cellulaires totales. Un mélange pyruvate/malate (2 M : 0,8 M) est ajouté pour induire le transport des électrons au niveau de la chaîne respiratoire du NADH à l'O₂ via le complexe I pendant que le complexe II est inhibé avec 5 mM d'acide malonique. Le succinate est utilisé pour donner des électrons au niveau du complexe II alors que le complexe I est inhibé par 0,5 µM de roténone. Finalement, le cytochrome c réduit a été utilisé pour donner directement des électrons au complexe IV alors que le complexe I et II sont inhibés. Le niveau maximal de respiration a été mesuré en présence d'un découpleur d'énergie, du fccp (50-500 nM) et de l'oligomycine (1 µg/ml). La consommation d'oxygène non mitochondriale est mesurée à la fin de l'expérience suite à l'addition de 1 mM de KCN. La concentration et le rôle des substrats, inhibiteurs et découpleurs sont fournis dans le **Tableau 15**. Le taux de consommation d'oxygène des cellules intactes (non perméabilisées) est mesuré en utilisant des cellules dans du PBS en présence de 5 mM de glucose. 1 µg/ml d'oligomycine, du fccp dans une gamme de concentration de l'ordre de 50-500 nM et du KCN à 1 mM ont été ajoutés de manière séquentielle pour mesurer respectivement la consommation couplée, non couplée et la consommation d'oxygène non mitochondriale.

Composé	Concentration stock	Volume	Concentration finale	Conservation	Action
Digitonine	10 mg/ml (H ₂ O)		1 µg/mg de protéine	frais	Perméabilisation des cellules
Glucose	2 M (H ₂ O)	10 µl	10 mM	-20°C	Induction de la respiration
Malate	0,8 M (H ₂ O)	5 µl	2 mM	-20°C	Donneur électrons complexe I
Pyruvate	2 M (H ₂ O)	5 µl	5 mM	frais	Donneur électrons complexe I
Succinate	1 M (H ₂ O)	20 µl	10 mM	-20°C	Donneur électrons complexe II
Cytochrome c (reduit)	4 mM (H ₂ O)	5 µl	10 µM	-20°C	Donneur électrons complexe IV
Ascorbate	0,8 M (H ₂ O)	5 µl	2 mM	-20°C	Donneur électrons complexe IV
TMPD	0,2 M (H ₂ O)	5 µl	0,5 mM	-20°C	Donneur électrons complexe IV
FCCP	0,1 mM (EtOH)	1 µl	10 nM	-20°C	Agent découplant (ionophore)
Roténone	1 mM (EtOH)	1 µl	0,5 µM	-20°C	Inhibiteur complexe I
Acide malonique	2 M (H ₂ O)	5 µl	5 mM	-20°C	Inhibiteur complexe II
Oligomycine	2 mg/ml (EtOH)	1 µl	1 µg/ml	-20°C	Inhibiteur ATP synthase
KCN	1 M (H ₂ O)	2 µl	1 mM	frais	Inhibiteur cytochrome C oxydase (arrêt respiration)

■ Substrat ■ Découpleur ■ Inhibiteur

Tableau 15 : Tableau récapitulatif des composés utilisés pour la mesure de la consommation d'oxygène

Les substrats (bleu), découpleurs (vert) et inhibiteur (rouge) utilisés lors de l'étude de la mesure de la consommation d'oxygène des cellules sont indiqués dans ce tableau. Les solvants utilisés pour la dilution des différents composés sont indiqués entre parenthèses.

BIBLIOGRAPHIE

**« Les articles de fond
ne remontent jamais à la surface »**

Boris Vian

**A**

Adlam, V.J., Harrison, J.C., Porteous, C.M., James, A.M., Smith, R.A., Murphy, M.P., and Sammut, I.A. (2005). Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 19, 1088-1095.

Ahola-Erkila, S., Carroll, C.J., Peltola-Mjosund, K., Tulkki, V., Mattila, I., Seppanen-Laakso, T., Oresic, M., Tyynismaa, H., and Suomalainen, A. (2010). Ketogenic diet slows down mitochondrial myopathy progression in mice. *Hum Mol Genet* 19, 1974-1984.

Alexeyev, M.F., Venediktova, N., Pastukh, V., Shokolenko, I., Bonilla, G., and Wilson, G.L. (2008). Selective elimination of mutant mitochondrial genomes as therapeutic strategy for the treatment of NARP and MILS syndromes. *Gene Ther* 15, 516-523.

Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., and Lipman, D.J. (1990). Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215, 403-410.

Andrews, R.M., Griffiths, P.G., Chinnery, P.F., and Turnbull, D.M. (1999). Evaluation of bupivacaine-induced muscle regeneration in the treatment of ptosis in patients with chronic progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *Eye (Lond)* 13 (Pt 6), 769-772.

B

Bacman, S.R., Williams, S.L., Garcia, S., and Moraes, C.T. (2010). Organ-specific shifts in mtDNA heteroplasmy following systemic delivery of a mitochondria-targeted restriction endonuclease. *Gene Ther* 17, 713-720.

Balaban, R.S., Nemoto, S., and Finkel, T. (2005). Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell* 120, 483-495.

Bannwarth, S., Procaccio, V., Lebre, A.S., Jardel, C., Chaussonot, A., Hoarau, C., Maoulida, H., Charrier, N., Gai, X., Xie, H.M., *et al.* (2013). Prevalence of rare mitochondrial DNA mutations in mitochondrial disorders. *J Med Genet*.

Becker-Hapak, M., McAllister, S.S., and Dowdy, S.F. (2001). TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods* 24, 247-256.

Belanger, K.G., Mirzayan, C., Kreuzer, H.E., Alberts, B.M., and Kreuzer, K.N. (1996). Two-dimensional gel analysis of rolling circle replication in the presence and absence of bacteriophage T4 primase. *Nucleic Acids Res* 24, 2166-2175.

Bogenhagen, D.F. (2012). Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta* 1819, 914-920.

Bogenhagen, D.F., Rousseau, D., and Burke, S. (2008). The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem* 283, 3665-3675.

- Bolte, S., and Cordelieres, F.P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224, 213-232.
- Bonnet, C., Augustin, S., Ellouze, S., Benit, P., Bouaita, A., Rustin, P., Sahel, J.A., and Corral-Debrinski, M. (2008). The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes. *Biochim Biophys Acta* 1783, 1707-1717.
- Boshoff, H.I., and Barry, C.E., 3rd (2005). Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth. *Nat Rev Microbiol* 3, 70-80.
- Bouzaidi-Tiali, N., Aeby, E., Charriere, F., Pusnik, M., and Schneider, A. (2007). Elongation factor 1a mediates the specificity of mitochondrial tRNA import in *T. brucei*. *Embo J* 26, 4302-4312.
- Bowmaker, M., Yang, M.Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Jacobs, H.T., Huberman, J.A., and Holt, I.J. (2003). Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *J Biol Chem* 278, 50961-50969.
- Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1987). The localization of replication origins on ARS plasmids in *S. cerevisiae*. *Cell* 51, 463-471.
- Brewer, B.J., and Fangman, W.L. (1991). Mapping replication origins in yeast chromosomes. *Bioessays* 13, 317-322.
- Brown, D.T., Herbert, M., Lamb, V.K., Chinnery, P.F., Taylor, R.W., Lightowlers, R.N., Craven, L., Cree, L., Gardner, J.L., and Turnbull, D.M. (2006). Transmission of mitochondrial DNA disorders: possibilities for the future. *Lancet* 368, 87-89.
- Brown, T.A., Tkachuk, A.N., Shtengel, G., Kopek, B.G., Bogenhagen, D.F., Hess, H.F., and Clayton, D.A. (2012). Superresolution fluorescence imaging of mitochondrial nucleoids reveals their spatial range, limits, and membrane interaction. *Mol Cell Biol* 31, 4994-5010.
- Burger, G., Gray, M.W., and Lang, B.F. (2003). Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet* 19, 709-716.

C

- Campello, S., and Scorrano, L. (2010). Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology. *EMBO Rep* 11, 678-684.
- Cao, L., Shitara, H., Horii, T., Nagao, Y., Imai, H., Abe, K., Hara, T., Hayashi, J., and Yonekawa, H. (2007). The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nat Genet* 39, 386-390.
- Chacinska, A., Koehler, C.M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138, 628-644.
- Chinnery, P.F., Taylor, R.W., Diekert, K., Lill, R., Turnbull, D.M., and Lightowlers, R.N. (1999). Peptide nucleic acid delivery to human mitochondria. *Gene Ther* 6, 1919-1928.

Christian, B.E., and Spremulli, L.L. (2012). Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1819, 1035-1054.

Comte, C., Tonin, Y., Heckel-Mager, A.M., Boucheham, A., Smirnov, A., Aure, K., Lombes, A., Martin, R.P., Entelis, N., and Tarassov, I. (2013). Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome. *Nucleic Acids Res* 41, 418-433.

Corona, P., Antozzi, C., Carrara, F., D'Incerti, L., Lamantea, E., Tiranti, V., and Zeviani, M. (2001). A novel mtDNA mutation in the ND5 subunit of complex I in two MELAS patients. *Ann Neurol* 49, 106-110.

Craven, L., Tuppen, H.A., Greggains, G.D., Harbottle, S.J., Murphy, J.L., Cree, L.M., Murdoch, A.P., Chinnery, P.F., Taylor, R.W., Lightowlers, R.N., *et al.* (2011). Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* 465, 82-85.

Cree, L.M., Samuels, D.C., de Sousa Lopes, S.C., Rajasimha, H.K., Wonnapijit, P., Mann, J.R., Dahl, H.H., and Chinnery, P.F. (2008). A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nat Genet* 40, 249-254.

D

D'Aurelio, M., Pallotti, F., Barrientos, A., Gajewski, C.D., Kwong, J.Q., Bruno, C., Beal, M.F., and Manfredi, G. (2001). In vivo regulation of oxidative phosphorylation in cells harboring a stop-codon mutation in mitochondrial DNA-encoded cytochrome c oxidase subunit I. *J Biol Chem* 276, 46925-46932.

Dairaghi, D.J., Shadel, G.S., and Clayton, D.A. (1995). Addition of a 29 residue carboxyl-terminal tail converts a simple HMG box-containing protein into a transcriptional activator. *J Mol Biol* 249, 11-28.

Damas, J., Carneiro, J., Goncalves, J., Stewart, J.B., Samuels, D.C., Amorim, A., and Pereira, F. (2012). Mitochondrial DNA deletions are associated with non-B DNA conformations. *Nucleic Acids Res* 40, 7606-7621.

de Grey, A.D. (2005). Forces maintaining organellar genomes: is any as strong as genetic code disparity or hydrophobicity? *Bioessays* 27, 436-446.

de Lonlay, P., Valnot, I., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Tzagoloff, A., Taanman, J.W., Benayoun, E., Chretien, D., Kadhom, N., Lombes, A., *et al.* (2001). A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat Genet* 29, 57-60.

De Luca, C., Besagni, C., Frontali, L., Bolotin-Fukuhara, M., and Francisci, S. (2006). Mutations in yeast mt tRNAs: specific and general suppression by nuclear encoded tRNA interactors. *Gene* 377, 169-176.

De Meirleir, L., Seneca, S., Lissens, W., De Clercq, I., Eyskens, F., Gerlo, E., Smet, J., and Van Coster, R. (2004). Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *J Med Genet* 41, 120-124.

Detmer, S.A., and Chan, D.C. (2007). Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 870-879.

Di Giovanni, S., Mirabella, M., Spinazzola, A., Crociani, P., Silvestri, G., Broccolini, A., Tonali, P., Di Mauro, S., and Servidei, S. (2001). Coenzyme Q10 reverses pathological phenotype and reduces apoptosis in familial CoQ10 deficiency. *Neurology* 57, 515-518.

DiMauro, S., Bonilla, E., Zeviani, M., Nakagawa, M., and DeVivo, D.C. (1985). Mitochondrial myopathies. *Ann Neurol* 17, 521-538.

DiMauro, S., and Schon, E.A. (2003). Mitochondrial respiratory-chain diseases. *N Engl J Med* 348, 2656-2668.

Dussurget, O., and Roulland-Dussoix, D. (1994). Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera. *Appl Environ Microbiol* 60, 953-959.

E

Entelis, N., Brandina, I., Kamenski, P., Krasheninnikov, I.A., Martin, R.P., and Tarassov, I. (2006). A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes Dev* 20, 1609-1620.

Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Dogan, S., Martin, R.P., and Tarassov, I.A. (2001). 5 S rRNA and tRNA Import into Human Mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *J Biol Chem* 276, 45642-45653.

Ernster, L., and Schatz, G. (1981). Mitochondria: a historical review. *J Cell Biol* 91, 227s-255s.

F

Falkenberg, M., Larsson, N.G., and Gustafsson, C.M. (2007). DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annu Rev Biochem* 76, 679-699.

Fan, W., Waymire, K.G., Narula, N., Li, P., Rocher, C., Coskun, P.E., Vannan, M.A., Narula, J., Macgregor, G.R., and Wallace, D.C. (2008). A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science* 319, 958-962.

Fernandez-Silva, P., Enriquez, J.A., and Montoya, J. (2003). Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA. *Exp Physiol* 88, 41-56.

Fernandez-Silva, P., Martinez-Azorin, F., Micol, V., and Attardi, G. (1997). The human mitochondrial transcription termination factor (mTERF) is a multizipper protein but binds to DNA as a monomer, with evidence pointing to intramolecular leucine zipper interactions. *Embo J* 16, 1066-1079.

Fernandez-Silva, P., Micol, V., and Attardi, G. (1996). Mitochondrial DNA transcription initiation and termination using mitochondrial lysates from cultured human cells. *Methods Enzymol* 264, 129-139.

Feuermann, M., Francisci, S., Rinaldi, T., De Luca, C., Rohou, H., Frontali, L., and Bolotin-Fukuhara, M. (2003). The yeast counterparts of human 'MELAS' mutations cause mitochondrial dysfunction that can be rescued by overexpression of the mitochondrial translation factor EF-Tu. *EMBO Rep* 4, 53-58.

Flierl, A., Chen, Y., Coskun, P.E., Samulski, R.J., and Wallace, D.C. (2005). Adeno-associated virus-mediated gene transfer of the heart/muscle adenine nucleotide translocator (ANT) in mouse. *Gene Ther* 12, 570-578.

Fridlender, B., Fry, M., Bolden, A., and Weissbach, A. (1972). A new synthetic RNA-dependent DNA polymerase from human tissue culture cells (HeLa-fibroblast-synthetic oligonucleotides-template-purified enzymes). *Proc Natl Acad Sci U S A* 69, 452-455.

Fulka, J., Jr., Fulka, H., and John, J.C. (2007). Transmission of mitochondrial DNA disorders: possibilities for the elimination of mutated mitochondria. *Cloning Stem Cells* 9, 47-50.

G

Gilkerson, R.W., Schon, E.A., Hernandez, E., and Davidson, M.M. (2008). Mitochondrial nucleoids maintain genetic autonomy but allow for functional complementation. *J Cell Biol* 181, 1117-1128.

Goto, Y., Nonaka, I., and Horai, S. (1990). A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 348, 651-653.

Graham, B.H., Waymire, K.G., Cottrell, B., Trounce, I.A., MacGregor, G.R., and Wallace, D.C. (1997). A mouse model for mitochondrial myopathy and cardiomyopathy resulting from a deficiency in the heart/muscle isoform of the adenine nucleotide translocator. *Nat Genet* 16, 226-234.

Gray, R.E., Law, R.H., Devenish, R.J., and Nagley, P. (1996). Allotopic expression of mitochondrial ATP synthase genes in nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 264, 369-389.

H

Hawke, T.J., and Garry, D.J. (2001). Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol* 91, 534-551.

He, J., Cooper, H.M., Reyes, A., Di Re, M., Sembongi, H., Litwin, T.R., Gao, J., Neuman, K.C., Fearnley, I.M., Spinazzola, A., *et al.* (2012). Mitochondrial nucleoid interacting proteins support mitochondrial protein synthesis. *Nucleic Acids Res* 40, 6109-6121.

Hollenbeck, P.J., and Saxton, W.M. (2005). The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118, 5411-5419.

Holt, I.J., Lorimer, H.E., and Jacobs, H.T. (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* 100, 515-524.

Holt, I.J., Miller, D.H., and Harding, A.E. (1989). Genetic heterogeneity and mitochondrial DNA heteroplasmy in Leber's hereditary optic neuropathy. *J Med Genet* 26, 739-743.

Hyvarinen, A.K., Pohjoismaki, J.L., Reyes, A., Wanrooij, S., Yasukawa, T., Karhunen, P.J., Spelbrink, J.N., Holt, I.J., and Jacobs, H.T. (2007). The mitochondrial transcription termination factor mTERF modulates replication pausing in human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* 35, 6458-6474.

I

Iannuccelli, E., Mompert, F., Gellin, J., Lahbib-Mansais, Y., Yerle, M., and Boudier, T. (2010). NEMO: a tool for analyzing gene and chromosome territory distributions from 3D-FISH experiments. *Bioinformatics* 26, 696-697.

Iborra, F.J., Kimura, H., and Cook, P.R. (2004). The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC Biol* 2, 9.

Ikeda, S., and Ozaki, K. (1997). Action of mitochondrial endonuclease G on DNA damaged by L-ascorbic acid, peplomycin, and cis-diamminedichloroplatinum (II). *Biochem Biophys Res Commun* 235, 291-294.

J

Jenuth, J.P., Peterson, A.C., and Shoubridge, E.A. (1997). Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat Genet* 16, 93-95.

K

Kaguni, L.S. (2004). DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annu Rev Biochem* 73, 293-320.

Kamenski, P., Kolesnikova, O., Jubenot, V., Entelis, N., Krashennnikov, I.A., Martin, R.P., and Tarassov, I. (2007). Evidence for an Adaptation Mechanism of Mitochondrial Translation via tRNA Import from the Cytosol. *Molecular cell* 26, 625-637.

Kang, D., Miyako, K., Kai, Y., Irie, T., and Takeshige, K. (1997). In vivo determination of replication origins of human mitochondrial DNA by ligation-mediated polymerase chain reaction. *J Biol Chem* 272, 15275-15279.

Kang, H.C., Lee, Y.M., Kim, H.D., Lee, J.S., and Slama, A. (2007). Safe and effective use of the ketogenic diet in children with epilepsy and mitochondrial respiratory chain complex defects. *Epilepsia* 48, 82-88.

Karicheva, O.Z., Kolesnikova, O.A., Schirtz, T., Vysokikh, M.Y., Mager-Heckel, A.M., Lombes, A., Boucheham, A., Krashennnikov, I.A., Martin, R.P., Entelis, N., *et al.* (2011). Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria. *Nucleic Acids Res.*

Kaufman, B.A., Durisic, N., Mativetsky, J.M., Costantino, S., Hancock, M.A., Grutter, P., and Shoubridge, E.A. (2007). The mitochondrial transcription factor TFAM coordinates the assembly of multiple DNA molecules into nucleoid-like structures. *Mol Biol Cell* 18, 3225-3236.

Kazak, L., Reyes, A., and Holt, I.J. (2012). Minimizing the damage: repair pathways keep mitochondrial DNA intact. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 659-671.

Keeney, P.M., Quigley, C.K., Dunham, L.D., Papageorge, C.M., Iyer, S., Thomas, R.R., Schwarz, K.M., Trimmer, P.A., Khan, S.M., Portell, F.R., *et al.* (2009). Mitochondrial gene therapy augments mitochondrial physiology in a Parkinson's disease cell model. *Hum Gene Ther* 20, 897-907.

- Kerscher, S., Grgic, L., Garofano, A., and Brandt, U. (2004). Application of the yeast *Yarrowia lipolytica* as a model to analyse human pathogenic mutations in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *Biochim Biophys Acta* 1659, 197-205.
- Kibbe, W.A. (2007). OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* 35, W43-46.
- King, M.P., and Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246, 500-503.
- Klug, A. (2010). The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem* 79, 213-231.
- Koc, E.C., Burkhart, W., Blackburn, K., Moyer, M.B., Schlatzer, D.M., Moseley, A., and Spremulli, L.L. (2001). The large subunit of the mammalian mitochondrial ribosome. Analysis of the complement of ribosomal proteins present. *J Biol Chem* 276, 43958-43969.
- Koga, Y., Povalko, N., Nishioka, J., Katayama, K., Kakimoto, N., and Matsuishi, T. (2010). MELAS and L-arginine therapy: pathophysiology of stroke-like episodes. *Ann N Y Acad Sci* 1201, 104-110.
- Kogelnik, A.M., Lott, M.T., Brown, M.D., Navathe, S.B., and Wallace, D.C. (1996). MITOMAP: a human mitochondrial genome database. *Nucleic Acids Res* 24, 177-179.
- Kolesnikova, O., Kazakova, H., Comte, C., Steinberg, S., Kamenski, P., Martin, R.P., Tarassov, I., and Entelis, N. (2010). Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria. *RNA* 16, 926-941.
- Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Jacquin-Becker, C., Goltzene, F., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., Lightowlers, R.N., Martin, R.P., and Tarassov, I. (2004). Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum Mol Genet* 13, 2519-2534.
- Koopman, W.J., Distelmaier, F., Smeitink, J.A., and Willems, P.H. (2013). OXPHOS mutations and neurodegeneration. *EMBO J* 32, 9-29.
- Korhonen, J.A., Pham, X.H., Pellegrini, M., and Falkenberg, M. (2004). Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *EMBO J* 23, 2423-2429.
- Krishnan, K.J., Reeve, A.K., Samuels, D.C., Chinnery, P.F., Blackwood, J.K., Taylor, R.W., Wanrooij, S., Spelbrink, J.N., Lightowlers, R.N., and Turnbull, D.M. (2008). What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nat Genet* 40, 275-279.
- Kucharczyk, R., Rak, M., and di Rago, J.P. (2009). Biochemical consequences in yeast of the human mitochondrial DNA 8993T>C mutation in the ATPase6 gene found in NARP/MILS patients. *Biochim Biophys Acta* 1793, 817-824.
- Kyriakouli, D.S., Boesch, P., Taylor, R.W., and Lightowlers, R.N. (2008). Progress and prospects: gene therapy for mitochondrial DNA disease. *Gene Ther* 15, 1017-1023.

L

Larsson, N.G. (2010). Somatic mitochondrial DNA mutations in mammalian aging. *Annu Rev Biochem* 79, 683-706.

Larsson, N.G., Wang, J., Wilhelmsson, H., Oldfors, A., Rustin, P., Lewandoski, M., Barsh, G.S., and Clayton, D.A. (1998). Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice [see comments]. *Nat Genet* 18, 231-236.

Leigh, D. (1951). Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 14, 216-221.

Lestienne, P., and Ponsot, G. (1988). Kearns-Sayre syndrome with muscle mitochondrial DNA deletion. *Lancet* 1, 885.

Li, R., and Guan, M.X. (2010). Human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase corrects mitochondrial dysfunctions due to the tRNA^{Leu}(UUR) A3243G mutation, associated with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like symptoms and diabetes. *Mol Cell Biol* 30, 2147-2154.

Litonin, D., Sologub, M., Shi, Y., Savkina, M., Anikin, M., Falkenberg, M., Gustafsson, C.M., and Temiakov, D. (2010). Human mitochondrial transcription revisited: only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro. *J Biol Chem* 285, 18129-18133.

Lorimer, H.E. (2002). 2D gel electrophoresis of mtDNA. *Methods Mol Biol* 197, 187-196.

Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L., and Afzelius, B. (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J Clin Invest* 41, 1776-1804.

M

Maalouf, M., Sullivan, P.G., Davis, L., Kim, D.Y., and Rho, J.M. (2007). Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 145, 256-264.

Madsen, C.S., Ghivizzani, S.C., and Hauswirth, W.W. (1993). Protein binding to a single termination-associated sequence in the mitochondrial DNA D-loop region. *Mol Cell Biol* 13, 2162-2171.

Mahata, B., Mukherjee, S., Mishra, S., Bandyopadhyay, A., and Adhya, S. (2006). Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells. *Science* 314, 471-474.

Manfredi, G., Fu, J., Ojaimi, J., Sadlock, J.E., Kwong, J.Q., Guy, J., and Schon, E.A. (2002). Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nat Genet* 30, 394-399.

Martin-Parras, L., Lucas, I., Martinez-Robles, M.L., Hernandez, P., Krimer, D.B., Hyrien, O., and Schvartzman, J.B. (1998). Topological complexity of different populations of pBR322 as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Nucleic Acids Res* 26, 3424-3432.

Martin, M., Cho, J., Cesare, A.J., Griffith, J.D., and Attardi, G. (2005). Termination factor-mediated DNA loop between termination and initiation sites drives mitochondrial rRNA synthesis. *Cell* **123**, 1227-1240.

Matsushima, Y., Goto, Y., and Kaguni, L.S. (2010). Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM). *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 18410-18415.

Meier, T., and Buyse, G. (2009). Idebenone: an emerging therapy for Friedreich ataxia. *Journal of neurology* **256 Suppl 1**, 25-30.

Miller, J.C., Holmes, M.C., Wang, J., Guschin, D.Y., Lee, Y.L., Rupniewski, I., Beausejour, C.M., Waite, A.J., Wang, N.S., Kim, K.A., *et al.* (2007). An improved zinc-finger nuclease architecture for highly specific genome editing. *Nat Biotechnol* **25**, 778-785.

Minczuk, M., Papworth, M.A., Kolasinska, P., Murphy, M.P., and Klug, A. (2006). Sequence-specific modification of mitochondrial DNA using a chimeric zinc finger methylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 19689-19694.

Minczuk, M., Papworth, M.A., Miller, J.C., Murphy, M.P., and Klug, A. (2008). Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res* **36**, 3926-3938.

Montoya, J., Christianson, T., Levens, D., Rabinowitz, M., and Attardi, G. (1982). Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7195-7199.

Mori, T., Kagatsume, I., Shinomiya, K., Aoyama, Y., and Sera, T. (2009). Sandwiched zinc-finger nucleases harboring a single-chain FokI dimer as a DNA-cleavage domain. *Biochem Biophys Res Commun* **390**, 694-697.

Mueller, P.R., and Wold, B. (1989). In vivo footprinting of a muscle specific enhancer by ligation mediated PCR. *Science* **246**, 780-786.

Mukherjee, S., Mahata, B., Mahato, B., and Adhya, S. (2008). Targeted mRNA degradation by complex-mediated delivery of antisense RNAs to intracellular human mitochondria. *Hum Mol Genet* **17**, 1292-1298.

N

Nakada, K., and Hayashi, J. (2011). Transmitochondrial mice as models for mitochondrial DNA-based diseases. *Exp Anim* **60**, 421-431.

Nass, M.M., and Nass, S. (1963). Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. I. Fixation and Electron Staining Reactions. *J Cell Biol* **19**, 593-611.

Neupert, W. (2012). SnapShot: Mitochondrial architecture. *Cell* **149**, 722-722 e721.

Noh, H.S., Kim, Y.S., and Choi, W.S. (2008). Neuroprotective effects of the ketogenic diet. *Epilepsia* **49 Suppl 8**, 120-123.

O

Ojala, D., Montoya, J., and Attardi, G. (1981). tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria. *Nature* *290*, 470-474.

P

Palmieri, F., Pierri, C.L., De Grassi, A., Nunes-Nesi, A., and Fernie, A.R. (2011). Evolution, structure and function of mitochondrial carriers: a review with new insights. *Plant J* *66*, 161-181.

Park, C.B., Asin-Cayuela, J., Camara, Y., Shi, Y., Pellegrini, M., Gaspari, M., Wibom, R., Hultenby, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., *et al.* (2007). MTERF3 is a negative regulator of mammalian mtDNA transcription. *Cell* *130*, 273-285.

Pellegrini, M., Asin-Cayuela, J., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Larsson, N.G., and Gustafsson, C.M. (2009). MTERF2 is a nucleoid component in mammalian mitochondria. *Biochim Biophys Acta* *1787*, 296-302.

Perkins, G., Renken, C., Martone, M.E., Young, S.J., Ellisman, M., and Frey, T. (1997). Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol* *119*, 260-272.

Picard, M., Shirihai, O.S., Gentil, B.J., and Burelle, Y. (2013). Mitochondrial morphology transitions and functions: implications for retrograde signaling? *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* *304*, R393-406.

Pohjoismaki, J.L., and Goffart, S. (2011). Of circles, forks and humanity: Topological organisation and replication of mammalian mitochondrial DNA. *Bioessays* *33*, 290-299.

Pohjoismaki, J.L., Wanrooij, S., Hyvarinen, A.K., Goffart, S., Holt, I.J., Spelbrink, J.N., and Jacobs, H.T. (2006). Alterations to the expression level of mitochondrial transcription factor A, TFAM, modify the mode of mitochondrial DNA replication in cultured human cells. *Nucleic Acids Res* *34*, 5815-5828.

R

Rapoport, M., Saada, A., Elpeleg, O., and Lorberboum-Galski, H. (2008). TAT-mediated delivery of LAD restores pyruvate dehydrogenase complex activity in the mitochondria of patients with LAD deficiency. *Mol Ther* *16*, 691-697.

Rehling, P., Brandner, K., and Pfanner, N. (2004). Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol* *5*, 519-530.

Reyes, A., Yasukawa, T., and Holt, I.J. (2007). Analysis of replicating mitochondrial DNA by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Methods Mol Biol* *372*, 219-232.

Rinehart, J., Krett, B., Rubio, M.A., Alfonzo, J.D., and Soll, D. (2005). *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes Dev* *19*, 583-592.

Robberson, D.L., and Clayton, D.A. (1972). Replication of mitochondrial DNA in mouse L cells and their thymidine kinase - derivatives: displacement replication on a covalently-closed circular template. *Proc Natl Acad Sci U S A* *69*, 3810-3814.

Roy, M.D., Wittenhagen, L.M., and Kelley, S.O. (2005). Structural probing of a pathogenic tRNA dimer. *RNA* *11*, 254-260.

Rubinson, E.H., and Eichman, B.F. (2012). Nucleic acid recognition by tandem helical repeats. *Curr Opin Struct Biol* *22*, 101-109.

S

Sacconi, S., Salviati, L., Sue, C.M., Shanske, S., Davidson, M.M., Bonilla, E., Naini, A.B., De Vivo, D.C., and DiMauro, S. (2003). Mutation screening in patients with isolated cytochrome c oxidase deficiency. *Pediatr Res* *53*, 224-230.

Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *J Theor Biol* *14*, 255-274.

Salinas, T., Duchene, A.M., Delage, L., Nilsson, S., Glaser, E., Zaepfel, M., and Marechal-Drouard, L. (2006). The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* *103*, 18362-18367.

Santra, S., Gilkerson, R.W., Davidson, M., and Schon, E.A. (2004). Ketogenic treatment reduces deleted mitochondrial DNAs in cultured human cells. *Ann Neurol* *56*, 662-669.

Schmid, B., Schindelin, J., Cardona, A., Longair, M., and Heisenberg, M. (2010). A high-level 3D visualization API for Java and ImageJ. *BMC Bioinformatics* *11*, 274.

Schmidt, O., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2010). Mitochondrial protein import: from proteomics to functional mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* *11*, 655-667.

Schneider, A. (2011). Mitochondrial tRNA import and its consequences for mitochondrial translation. *Annu Rev Biochem* *80*, 1033-1053.

Schneider, C.A., Rasband, W.S., and Eliceiri, K.W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* *9*, 671-675.

Schon, E.A., DiMauro, S., and Hirano, M. (2012). Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat Rev Genet* *13*, 878-890.

Schon, E.A., Rizzuto, R., Moraes, C.T., Nakase, H., Zeviani, M., and DiMauro, S. (1989). A direct repeat is a hotspot for large-scale deletion of human mitochondrial DNA. *Science* *244*, 346-349.

Schvartzman, J.B., Martinez-Robles, M.L., Hernandez, P., and Krimer, D.B. (2010). Plasmid DNA replication and topology as visualized by two-dimensional agarose gel electrophoresis. *Plasmid* *63*, 1-10.

Seligmann, H., Krishnan, N.M., and Rao, B.J. (2006). Possible multiple origins of replication in primate mitochondria: Alternative role of tRNA sequences. *J Theor Biol* *241*, 321-332.

- Sharma, M.R., Koc, E.C., Datta, P.P., Booth, T.M., Spremulli, L.L., and Agrawal, R.K. (2003). Structure of the mammalian mitochondrial ribosome reveals an expanded functional role for its component proteins. *Cell* **115**, 97-108.
- Shutt, T.E., Lodeiro, M.F., Cotney, J., Cameron, C.E., and Shadel, G.S. (2010). Core human mitochondrial transcription apparatus is a regulated two-component system in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 12133-12138.
- Shy, G.M., and Gonatas, N.K. (1964). Human Myopathy with Giant Abnormal Mitochondria. *Science* **145**, 493-496.
- Smirnov, A., Comte, C., Mager-Heckel, A.M., Addis, V., Krasheninnikov, I.A., Martin, R.P., Entelis, N., and Tarassov, I. (2010). Mitochondrial enzyme rhodanese is essential for 5 S ribosomal RNA import into human mitochondria. *J Biol Chem* **285**, 30792-30803.
- Smirnov, A., Entelis, N., Martin, R.P., and Tarassov, I. (2011). Biological significance of 5S rRNA import into human mitochondria: role of ribosomal protein MRP-L18. *Genes Dev* **25**, 1289-1305.
- Smirnov, A., Tarassov, I., Mager-Heckel, A.M., Letzelter, M., Martin, R.P., Krasheninnikov, I.A., and Entelis, N. (2008). Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria. *RNA* **14**, 749-759.
- Smith, P.M., Ross, G.F., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., and Lightowers, R.N. (2004). Strategies for treating disorders of the mitochondrial genome. *Biochim Biophys Acta* **1659**, 232-239.
- Sohm, B., Sissler, M., Park, H., King, M.P., and Florentz, C. (2004). Recognition of human mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) by its cognate leucyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* **339**, 17-29.
- Spelbrink, J.N., Li, F.Y., Tiranti, V., Nikali, K., Yuan, Q.P., Tariq, M., Wanrooij, S., Garrido, N., Comi, G., Morandi, L., *et al.* (2001). Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* **28**, 223-231.
- Srivastava, S., and Moraes, C.T. (2001). Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Hum Mol Genet* **10**, 3093-3099.
- Stuart, J.A., Mayard, S., Hashiguchi, K., Souza-Pinto, N.C., and Bohr, V.A. (2005). Localization of mitochondrial DNA base excision repair to an inner membrane-associated particulate fraction. *Nucleic Acids Res* **33**, 3722-3732.
- Sukhorukov, V.M., Dikov, D., Reichert, A.S., and Meyer-Hermann, M. (2012). Emergence of the mitochondrial reticulum from fission and fusion dynamics. *PLoS Comput Biol* **8**, e1002745.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., and Schatten, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* **402**, 371-372.
- Suzuki, T., and Nagao, A. (2011). Human mitochondrial tRNAs: biogenesis, function, structural aspects, and diseases. *Annu Rev Genet* **45**, 299-329.
- Swerdlow, R.H. (2007). Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondrialopathies. *J Neurosci Res* **85**, 3416-3428.

T

Tachibana, M., Sparman, M., Sritanaudomchai, H., Ma, H., Clepper, L., Woodward, J., Li, Y., Ramsey, C., Kolotushkina, O., and Mitalipov, S. (2009). Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* *461*, 367-372.

Tamura, Y., Itoh, K., and Sesaki, H. (2011). SnapShot: Mitochondrial dynamics. *Cell* *145*, 1158, 1158 e1151.

Tarassov, I., Entelis, N., and Martin, R. (1995). Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *EMBO J* *14*, 3461-3471.

Taylor, R.W., Chinnery, P.F., Turnbull, D.M., and Lightowlers, R.N. (1997). Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication in vitro by peptide nucleic acids. *Nat Genet* *15*, 212-215.

Taylor, S.W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G.M., Warnock, D.E., Wiley, S., Murphy, A.N., Gaucher, S.P., Capaldi, R.A., Gibson, B.W., *et al.* (2003). Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol* *21*, 281-286.

Timmis, J.N., Ayliffe, M.A., Huang, C.Y., and Martin, W. (2004). Endosymbiotic gene transfer: organelle genomes forge eukaryotic chromosomes. *Nat Rev Genet* *5*, 123-135.

Trifunovic, A., Wredenberg, A., Falkenberg, M., Spelbrink, J.N., Rovio, A.T., Bruder, C.E., Bohlooly, Y.M., Gidlof, S., Oldfors, A., Wibom, R., *et al.* (2004). Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature* *429*, 417-423.

Tyynismaa, H., Mjosund, K.P., Wanrooij, S., Lappalainen, I., Ylikallio, E., Jalanko, A., Spelbrink, J.N., Paetau, A., and Suomalainen, A. (2005). Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* *102*, 17687-17692.

U

Urnov, F.D., Rebar, E.J., Holmes, M.C., Zhang, H.S., and Gregory, P.D. (2010). Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nat Rev Genet* *11*, 636-646.

V

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

van der Laan, M., Bohnert, M., Wiedemann, N., and Pfanner, N. (2012). Role of MINOS in mitochondrial membrane architecture and biogenesis. *Trends Cell Biol* *22*, 185-192.

Vargas-Parada, L. (2010). Mitochondria and the immune response. *Nature Education* *3*.

W

Wai, T., Teoli, D., and Shoubridge, E.A. (2008). The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nat Genet* 40, 1484-1488.

Wang, Y., and Bogenhagen, D.F. (2006). Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. *J Biol Chem* 281, 25791-25802.

Wanrooij, S., and Falkenberg, M. (2010). The human mitochondrial replication fork in health and disease. *Biochim Biophys Acta* 1797, 1378-1388.

Wanrooij, S., Goffart, S., Pohjoismaki, J.L., Yasukawa, T., and Spelbrink, J.N. (2007). Expression of catalytic mutants of the mtDNA helicase Twinkle and polymerase POLG causes distinct replication stalling phenotypes. *Nucleic Acids Res* 35, 3238-3251.

Warner, A., and Vaziri, N.D. (1981). Treatment of lactic acidosis. *South Med J* 74, 841-847.

Wenz, T., Williams, S.L., Bacman, S.R., and Moraes, C.T. (2010). Emerging therapeutic approaches to mitochondrial diseases. *Dev Disabil Res Rev* 16, 219-229.

Y

Yamada, Y., Akita, H., Kogure, K., Kamiya, H., and Harashima, H. (2007). Mitochondrial drug delivery and mitochondrial disease therapy--an approach to liposome-based delivery targeted to mitochondria. *Mitochondrion* 7, 63-71.

Yang, M.Y., Bowmaker, M., Reyes, A., Vergani, L., Angeli, P., Gringeri, E., Jacobs, H.T., and Holt, I.J. (2002). Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication. *Cell* 111, 495-505.

Z

Zeviani, M., Servidei, S., Gellera, C., Bertini, E., DiMauro, S., and DiDonato, S. (1989). An autosomal dominant disorder with multiple deletions of mitochondrial DNA starting at the D-loop region. *Nature* 339, 309-311.

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

Zhu, Z., Yao, J., Johns, T., Fu, K., De Bie, I., Macmillan, C., Cuthbert, A.P., Newbold, R.F., Wang, J., Chevrette, M., *et al.* (1998). SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome. *Nat Genet* 20, 337-343.

Zinchuk, V., Zinchuk, O., and Okada, T. (2007). Quantitative colocalization analysis of multicolor confocal immunofluorescence microscopy images: pushing pixels to explore biological phenomena. *Acta Histochem Cytochem* 40, 101-111.

Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res* 31, 3406-3415.

RESUME DE LA THESE

**« La synthèse du monde peut se
résumer en ces deux mots : oui et non »**

Pierre Dac

Contexte scientifique

Impliquées dans de nombreuses voies métaboliques allant de la respiration cellulaire à l'apoptose, les mitochondries sont des organites subcellulaires essentiels aux cellules eucaryotiques. De multiples altérations peuvent avoir lieu dans le génome mitochondrial (délétions, duplications, mutations ponctuelles) entraînant de sévères répercussions sur la respiration cellulaire et conduisant dès lors à l'apparition de nombreuses pathologies, pour la plupart des myopathies ou des maladies neurodégénératives. A ce jour, plus de 250 affections dont l'origine vient de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ont été dénombrées. La majorité de ces mutations sont dites hétéroplasmiques, signifiant que l'ADNmt peut coexister sous 2 formes (sauvage et mutée) au sein d'une même cellule. L'apparition et la sévérité de ces maladies dépendent alors du taux d'hétéroplasmie, les symptômes n'apparaissent généralement qu'à partir d'un seuil de l'ordre de 60 à 80%. Bien qu'à ce jour il n'existe aucun traitement efficace pour traiter de telles affections, diverses stratégies sont envisagées pour tenter d'enrayer ces maladies.

La première d'entre elles consiste en l'expression nucléaire du gène d'intérêt suivie par l'adressage de son produit d'expression dans les mitochondries où il remplacera son homologue mutant, cette stratégie dite allotopique peut être utilisée pour des protéines en exploitant le mécanisme d'import de la protéine immature. Cependant, cette approche est limitée par la grande hydrophobicité des protéines codées par l'ADNmt, ce qui compromet fortement leur import. Pour cette raison, une autre idée a été développée pour adresser directement des ARNm vers la surface des mitochondries et permettre un import co-translationnel et ainsi éviter la formation d'agrégats cytoplasmiques. En dépit de la récupération des fonctions respiratoires, ce genre de stratégie reste à tester sur des modèles animaux.

La seconde approche, et qui semble être une des approches les plus prometteuses est la stratégie anti-génomique. S'appuyant sur le principe d'hétéroplasmie, cette approche vise à induire un changement du niveau d'hétéroplasmie pour diminuer la quantité d'ADNmt mutant au profit de la forme saine du génome mitochondrial. Cette inhibition peut être réalisée soit par la dégradation du génome mutant en utilisant par exemple une endonucléase encodée par le génome nucléaire et fusionnée à un peptide signal. Celle-ci une fois importée dans les mitochondries clivera l'ADNmt mutant, seul à détenir le site de clivage ciblé par l'endonucléase. Ceci est rendu possible par la présence d'un site de restriction uniquement présent au sein du génome mutant et qui conduira à une diminution du nombre de molécules d'ADNmt mutant, une augmentation de la proportion des molécules saines et la reprise de la production d'ATP. L'utilisation de cette méthode à des fins thérapeutiques est certes puissante, mais est limitée par une faible fréquence de mutations pathogènes créant un site de restriction unique.

L'autre méthode pour manipuler le niveau d'hétéroplasmie consiste à inhiber spécifiquement la réplication de l'ADNmt mutant. Ceci a déjà été tenté par le passé via le développement des PNA (ou Peptide Nucleic Acids) qui sont de petites molécules artificielles présentant une forte affinité pour l'ADNmt. Il a ainsi été démontré que ces PNA pouvaient *in vitro* inhiber la réplication de l'ADNmt mutant qu'ils ciblent. Bien qu'attrayante, cette approche n'a pas pu être appliquée à des cellules vivantes en raison de l'impossibilité d'importer *in vivo* ces molécules dans les mitochondries.

Au laboratoire, nous nous intéressons à la voie d'import des ARN dans les mitochondries, mécanisme qui semble être l'unique voie naturelle pour adresser des acides nucléiques dans ces organites. Cette propriété constitue dès lors un moyen idéal d'introduire dans les mitochondries des molécules artificielles capables de restaurer les fonctions mitochondriales par le biais d'une approche anti-génomique.

Pour ce faire, notre modèle s'appuie sur l'étude des caractéristiques structurales de l'ARNt^{Lys}_{CUU} (TRK1) de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. De précédentes études menées au laboratoire ont pu démontrer que cet ARNt cytosolique de levure pouvait être importé dans les mitochondries humaines pour compenser les défauts respiratoires dus à un dysfonctionnement de l'ARNt^{Lys} mitochondrial associé au syndrome MERRF. Les déterminants d'import de TRK1 ont été identifiés ouvrant alors la possibilité d'exploiter la flexibilité de ce système pour créer un vecteur mitochondrial pour les cellules humaines.

Dans cette optique, nous avons modélisé et synthétisé de petits ARN artificiels formés sur la base de 2 domaines en tige-boucle induisant leur adressage dans les mitochondries et d'une séquence capable de s'hybrider spécifiquement à l'ADNmt mutant, l'objectif étant d'en stopper, du moins partiellement, sa réplication et de donner ainsi un avantage répliatif aux molécules d'ADNmt sauvage. La cible initiale de ces molécules thérapeutiques a été un ADNmt ayant une large délétion de 7 kb responsable du Syndrome de Kearns Sayre (KSS). Après transfection avec ces ARN transgéniques, nous avons réussi à induire une diminution de l'ordre de 30% du taux d'hétéroplasmie dans des cellules cybrides porteuses de la large délétion. Après avoir pu prouver la validité de cette méthode, nous avons souhaité appliquer cette même stratégie à des mutations ponctuelles localisées dans différentes régions de l'ADNmt, constituant le présent projet.

Objectifs

Les objectifs poursuivis dans cette étude ont été :

- i) de démontrer l'impact des ARN recombinants sur le mécanisme de réplication par la mise au point de techniques permettant la visualisation et l'analyse des intermédiaires de réplication par électrophorèse bidimensionnelle.
- ii) d'optimiser les effets observés sur la délétion KSS par le développement de molécules modifiées portant des groupements chimiques permettant d'accroître l'efficacité de leur stabilité au sein de la cellule ainsi que leur interaction avec l'ADNmt mutant pour en augmenter les effets sur la baisse d'hétéroplasmie déjà observée.
- iii) d'étendre la stratégie anti-génomique à des mutations ponctuelles notamment au niveau du gène de l'ARNt^{Leu} mitochondrial (UUR) (A3243>G), mutation responsable du syndrome MELAS, une myopathie avec un large spectre de phénotypes cliniques ainsi qu'à des mutations touchant les gènes codant pour COX I (A7339>G) et ND5 (A13514>G), sous-unités de la chaîne respiratoire dont les mutations sont également pathogéniques.

Le but de ces travaux est donc de développer de nouveaux modèles de thérapie génique s'appuyant sur la voie d'adressage des ARN dans les mitochondries pour tenter d'enrayer les maladies mitochondriales et de lever les obstacles qui empêchaient jusqu'à présent l'introduction de molécules artificielles à but thérapeutique dans ces organites.

Résultats

Le premier de mes objectifs a consisté à poursuivre l'étude amorcée avec les ARN anti-répliatif dirigés contre la délétion KSS. Les données obtenues à partir de cette mutation ont pu établir la viabilité de la méthode, une diminution de l'hétéroplasmie de plus de 30% ayant été observée de manière transitoire. Dans la continuité de ces travaux, j'ai eu pour objectif d'étudier les intermédiaires de réplication générés lors du blocage du réplisome par les ARN anti-répliatifs. Pour cela, j'ai appliqué et optimisé la technique d'électrophorèse bidimensionnelle pour de l'ADNmt, technique encore jamais utilisée au laboratoire. Cette méthode a pour but d'identifier les zones de l'ADNmt où se produit un arrêt de la réplication et nous a servi ici à démontrer l'impact des ARN recombinants sur le mécanisme de réplication. J'ai ainsi pu mettre en évidence qu'après transfection avec les ARN recombinants dirigés contre la large délétion, un arrêt de la réplication avait lieu et ce au niveau de la zone de la délétion ciblée par les ARN. Ces travaux ajoutés aux précédentes études menées sur la délétion ont conduit à la publication d'un papier compilant l'ensemble de nos résultats (Comte et al, 2013).

En parallèle, j'ai également tenté de stabiliser cet effet au-delà du 6^{ème} jour suivant la transfection. Pour cela, j'ai testé tout un jeu d'oligonucléotides chimériques, c'est-à-dire possédant des déterminants d'import ARN mais associé à insert ADN, ainsi que des oligonucléotides modifiés chimiquement (groupements méthyles, bases inversées...) censés avoir une spécificité et une stabilité accrues. Je souhaitais ainsi voir si l'ajout de modifications sur des ARN ayant démontré leur potentiel anti-répliatif permettrait d'en accroître l'efficacité. Les différents tests effectués sur ce panel d'ARN ont montré une très haute spécificité vis-à-vis de l'ADNmt délété, une stabilité accrue mais malheureusement aucun effet sur la diminution du taux d'hétéroplasmie.

Le second pan de mes recherches a eu pour but de développer cette stratégie anti-génomique pour l'appliquer à des mutations ponctuelles. Dans un premier temps, j'ai designé, synthétisé et testé plusieurs versions d'ARN synthétiques s'hybridant de manière spécifique à une région porteuse d'une mutation ponctuelle. J'ai ainsi débuté mon étude en ciblant une mutation associée au syndrome MELAS (A3243>G) et ensuite créé de nouvelles versions d'ARN vis-à-vis de mutations situées dans les gènes COX I (A7339>G) et ND5 (A13514>G), elles aussi associées à une pathologie. Pour ce faire, des inserts de longueur variable ont été insérés entre les déterminants d'import mitochondrial de TRK1 (boucles D et F) et l'ensemble de ces séquences a été soumis à une analyse *in silico* pour modéliser les structures secondaires adoptées. Les versions présentant une structure défavorable à l'import ou à l'hybridation sont écartées et ne sont retenues que celles où la structure des boucles D et F est conservée et ayant un insert linéaire, alors plus accessible pour s'hybrider à la zone ciblée de l'ADNmt mutant. Autre paramètre pris en compte, la température de fusion est un facteur important car les ARN retenus doivent garantir une hybridation stable

avec l'ADNmt mutant à température physiologique. Les ARN respectant ces critères de sélection sont alors transcrits *in vitro* avant que leur spécificité ne soit testée. Le but de cette étape est de vérifier que les ARN recombinants sélectionnés soient aptes à distinguer l'ADNmt mutant de la version saine du génome pour en stopper spécifiquement la réplication. Pour cela, la capacité et la spécificité d'hybridation sont testées *in vitro* par hybridation de type Southern dans des conditions proches des conditions physiologiques (température et concentration ionique). Les résultats obtenus montrent de manière générale que les ARNs ciblant de manière spécifique le fragment porteur de la mutation ont une longueur de 19-20 nucléotides.

Le second paramètre mesuré est la propension de ces ARN à être importés dans les mitochondries. Pour cela, j'ai effectué des tests d'import *in vivo* pour le vérifier car ce paramètre est crucial pour leur bon fonctionnement. Ainsi les ARN ayant montré une spécificité accrue envers l'ADNmt mutant ont été transfectés de manière transitoire dans des cellules cybrides. L'analyse du contenu cytoplasmique et mitochondrial de ces cellules a montré la présence des ARN recombinants au sein de la mitochondrie 2 jours après leur transfection, validant le second paramètre étudié. Disposant ainsi d'ARN aptes à discriminer ADNmt mutant et sauvage et importables au sein de la mitochondrie, restait à démontrer leur action sur le niveau d'hétéroplasmie. Des lignées de cellules cybride porteuses des différentes mutations étudiées ont été transfectées de manière transitoire avec les ARN correspondants et des échantillons d'ADN collectés jusqu'à 10 jours après la transfection. La mesure du taux d'hétéroplasmie s'appuie sur l'existence d'un site de restriction lié à l'émergence de la mutation.

Tandis que les expériences menées sur les mutations MELAS et COX I n'ont montré qu'une diminution du taux d'hétéroplasmie de l'ordre de 5% (soit la valeur de l'écart type mesuré), les transfections effectuées sur la lignée cellulaire porteuse de la mutation ND5 ont conduit à une diminution du taux d'hétéroplasmie de plus de 25%. Ces résultats pourraient trouver leur explication dans le fait que la localisation spatiale de la mutation au sein de l'ADNmt aurait son importance, rendant son accès aux ARN plus ou moins possible.

Conclusions – perspectives

En conclusion, au cours de ma thèse j'ai contribué à prouver la validité de l'approche anti-génomique dans le cas d'une large délétion dans l'ADNmt en mettant en évidence l'impact des ARN recombinants sur l'arrêt de la réplication *in vivo*. J'ai également modélisé et testé de nombreuses versions d'ARN recombinants s'hybridant de manière spécifique aux mutations ponctuelles ciblées. J'ai ainsi pu montrer qu'une approche anti-génomique exploitant le système d'import naturel des ARN mais surtout ciblant une mutation ponctuelle dans l'ADNmt était réalisable et efficace.

Dans la continuité de ce travail, les perspectives sont nombreuses. Tout d'abord, le mécanisme d'import de nos ARN recombinants reste une inconnue, il faudrait donc identifier les facteurs protéiques impliqués dans la prise en charge des ARN. Ensuite, il serait intéressant d'utiliser nos ARN comme un outil d'investigation qui nous permettrait de comprendre plus en détails à la fois le mode d'action de nos ARN et de manière plus générale les mécanismes de réplication qui s'appliquent, plusieurs hypothèses étant

avancées quant au mode de réplication de l'ADNmt. D'un point de vue plus appliqué, l'optimisation de cette stratégie anti-répllicative passerait par la mise au point d'une expression constitutive et stable des ARN pour ainsi permettre un effet à long terme.

Publications & communications

Publications

- **Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns Sayre Syndrome**
 C. Comte*, Y. Tonin*, A.-M. Mager-Heckel*, A. Boucheham, A. Smirnov, K. Aure, A. Lombès, R. Martin, N. Entelis, I. Tarassov (2013). Nucleic Acids Research 2013 Jan 7;41(1):418-33
 * *contribution égale à cette étude*
- **Mitochondrial targeting of RNA and mitochondrial translation.**
 I. Tarassov, I. Chicherin, Y. Tonin, A. Smirnov, P. Kamenski, N. Entelis (2013). Translation in mitochondria and other organelles. Springer series - Book chapter
- **Characterization of chemically modified oligonucleotides targeting a pathogenic mutation in human mitochondrial DNA**
Y. Tonin, A.-M. Mager-Heckel, I. Dovydenko, M. Meschaninova, C. Comte, A. Venyaminova, D. Pyshnyi, I. Tarassov, N. Entelis (2013) Biochimie – S0300-9084(13)00292-7. 10.1016
- **Modelling of antigenomic therapy of mitochondrial diseases by imported RNA targeting a pathogenic point mutation in mtDNA .**
Y. Tonin, A.-M. Mager-Heckel, M. Vysokikh, I. Dovydenko, M. Meschaninova, A. Venyaminova, I. Tarassov, N. Entelis (en cours de soumission)

Communications

- **Exploiting mitochondrial RNA import for modelling antigenomic strategy of mitochondrial diseases**
Y. Tonin, C. Comte, A.-M. Heckel, O. Karicheva, A. Lombès, R. Martin, I. Tarassov, N. Entelis (2010) - 3rd International Summer School "Supramolecular Systems in Chemistry and Biology" - Lviv (Ukraine) – Présentation poster
- **Développement d'une stratégie anti-génomique via l'exploitation de la voie d'import des ARN dans les mitochondries**
Y. Tonin, A.-M. Heckel, C. Comte, O. Karicheva, A. Lombès, R. Martin, I. Tarassov, N. Entelis (2011) - 5^{ème} Colloque Meetocondrie - La Colle-sur-Loup (France) - Présentation poster

- **Modelling antigenomic strategy of mitochondrial diseases by exploitation of mitochondrial RNA pathway**
 N. Entelis, C. Comte, A.-M. Heckel, Y. Tonin, O. Karicheva, A. Lombès, R. Martin, I. Tarassov (2011) - 60th Annual Meeting of the RNA Society – Kyoto (Japon) - Présentation poster
- **Modelling antigenomic strategy of mitochondrial diseases by imported oligonucleotides**
Y. Tonin, C. Comte, A.-M. Heckel, A. Lombès, R. Martin, I. Tarassov, N. Entelis (2012)– EMBO – FEBS course: Mitochondria in life, death and disease – Crète (Grèce) - Présentation poster
- **Design of therapeutic aptamers imported into mitochondria of human cells**
 I. Dovydenko, M. Meschaninova, Y. Tonin, A.-M. Heckel, I. Tarassov, A. Venyaminova, N. Entelis (2012) – 6th International Symposium “Supramolecular Systems in Chemistry and Biology” – Strasbourg (France) - Présentation poster
- **Cytosolic non-coding RNAs are fonctionnal inside the mitochondria**
 N. Entelis, Y. Tonin, A. Gowher, A.-M. Heckel, P. Kamenski, O. Karicheva (2012) – Cell Symposia : Fonctionnal RNA’s – Stiges (Espagne) – Présentation poster
- **Antigenomic strategy of mitochondrial diseases by exploitation of mitochondrial RNA import pathway**
 A.-M. Heckel, Y. Tonin, C. Comte, I. Dovydenko, A. Lombès, R. Martin, N. Entelis, I. Tarassov (2012) – 6^{ème} Colloque Meetochondrie - Soustons (France) - Présentation poster
- **Modelling antigenomic therapy of mitochondrial diseases by imported oligonucleotides**
Y. Tonin (2012)– Congrès MitoStrass – Strasbourg (France) - Présentation orale
- **Création et import d’ARN artificiels dans les mitochondries à des fins thérapeutiques**
Y. Tonin (2013)– Colloque Jeunes Chercheurs AFM – Paris (France) - Présentation orale
- **Mitochondrial diseases : modeling anti-genomic therapy by imported RNA**
 N. Entelis, Y. Tonin, A.-M. Heckel, I. Dovydenko, R. P. Martin, I. Tarassov (2013) – FEBS Congress – Saint-Pétersbourg (Russie) - Présentation orale

Prix et distinctions

- Prix de la meilleure présentation orale au Colloque Jeunes Chercheurs AFM – Paris (France) (2013)
 Création et import d’ARN artificiels dans les mitochondries à des fins thérapeutiques

RESUME

Impliquées dans de nombreuses voies métaboliques, les mitochondries sont des organites subcellulaires essentiels aux cellules eucaryotiques. De multiples altérations peuvent survenir dans le génome mitochondrial conduisant à l'apparition de nombreuses pathologies, pour la plupart des myopathies ou des maladies neurodégénératives. La majorité de ces mutations sont dites hétéroplasmiques, signifiant que l'ADNmt peut coexister sous 2 formes (sauvage et mutée) au sein d'une même cellule. L'apparition et la sévérité de ces maladies dépend alors du taux d'hétéroplasmie, les symptômes n'apparaissent généralement qu'à partir d'un seuil de l'ordre de 60 à 80%. Même s'il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace, une des approches actuelles vise à induire un changement du niveau d'hétéroplasmie pour diminuer la quantité d'ADNmt mutant au profit de la forme saine du génome mitochondrial. Cette stratégie est appelée stratégie anti-répllicative.

L'objectif de ce travail de thèse a consisté en la mise au point d'une telle stratégie thérapeutique, basée sur l'exploitation de la voie d'import des ARN dans les mitochondries. Pour ce faire, de petits ARN artificiels importables dans les mitochondries humaines ont été créés. Exploités comme vecteurs, ces ARN possèdent les déterminants structuraux nécessaires à leur import, ainsi qu'une séquence capable de s'hybrider spécifiquement à l'ADNmt mutant, l'objectif étant d'en stopper, du moins partiellement, sa réplication et de donner ainsi un avantage réplcatif aux molécules d'ADNmt sauvage.

Les résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de mettre en évidence l'impact direct des ARN recombinants sur la réplication du génome mitochondrial muté *in vivo*, et ainsi de prouver la validité de cette stratégie vis-à-vis d'une large délétion liée à un cas pathologique (syndrome de Kearns Sayre, KSS). Dans la continuité de ces travaux, nous avons également caractérisé l'effet de modifications chimiques sur la stabilité, l'import et l'efficacité de ces ARN recombinants.

Après avoir validé notre approche, nous avons souhaité étendre son action aux mutations ponctuelles. Pour cela, de nombreuses versions d'ARN anti-réplcatifs ont été modélisées et testées vis-à-vis de différentes mutations. Nous avons ainsi sélectionné des ARN capables de s'hybrider de manière spécifique au niveau de la région mutée de l'ADNmt. Suite à l'import mitochondrial de certains de ces ARN dans des cellules en culture, nous avons pu observer une diminution du taux d'hétéroplasmie pour une mutation pathogénique affectant le gène de la sous-unité ND5.

Par ces travaux, nous avons démontré qu'une approche anti-génomique exploitant la voie d'import des ARN est réalisable et efficace, cette étude constituant un essai prometteur dans le développement de thérapies à l'encontre des maladies mitochondriales.

Mots-clés : mitochondrie, import d'ARN, stratégie thérapeutique, oligonucléotides anti-réplcatif, hétéroplasmie