



**HAL**  
open science

# Caractérisation génétique des atteintes hépatiques mitochondriales

Marine Beinat

► **To cite this version:**

Marine Beinat. Caractérisation génétique des atteintes hépatiques mitochondriales. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. NNT: 2013PA05T007. tel-01195988

**HAL Id: tel-01195988**

**<https://theses.hal.science/tel-01195988>**

Submitted on 8 Sep 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.

**UNIVERSITÉ PARIS 5 RENÉ DESCARTES**

*Ecole Doctorale : Gc2iD*

---

**THÈSE**

pour obtenir le grade de

**DOCTEUR**

Sciences de la Vie et de la Santé

Discipline : Génétique Humaine

**Présentée et soutenue publiquement par**

**Marine Beinat**

**le 15 avril 2013**

<p><b>CARACTÉRISATION GÉNÉTIQUE DES ATTEINTES HÉPATIQUES MITOCHONDRIALES</b></p>
--

**Jury :**

Dr. Agnès Rötig

Directeur de thèse

Dr. Nathalie Bonnefoy

Rapporteur

Pr. Vincent Procaccio

Rapporteur

Pr. Emmanuel Jacquemin

Examineur

Pr. Pierre Landrieu

Examineur



# Remerciements

---

*Un très grand merci à Agnès Rötig, pour m'avoir accueillie dans son équipe. Merci pour ta disponibilité, ton soutien et ta forte réactivité durant les moments d'urgence. Merci d'avoir été toujours présente malgré les périodes de doutes et de difficultés que nous avons connus au cours de ce travail. Je souhaite beaucoup de succès et de futures publications pour l'équipe mito.*

*Je remercie le Docteur Nathalie Bonnefoy et le Professeur Vincent Procaccio, qui ont accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse. Je suis très reconnaissante de votre travail et un grand merci pour le temps que vous avez consacré à mon rapport.*

*Un merci chaleureux au docteur Pierre Landrieu d'avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse. Je suis très reconnaissante de vos conseils et de l'intérêt que vous m'avez prodigué tout au long de cette thèse.*

*Je remercie également le Professeur Emmanuel Jacquemin pour avoir examiné mon travail et pour votre contribution à mon travail de thèse grâce à votre cohorte de patients.*

*Enfin, je remercie particulièrement le Professeur Arnold Munnich pour avoir eu la chance de travailler au sein de l'unité U781. Merci pour votre dynamisme au quotidien et pour tous les enseignements que j'ai pu retenir durant ces années.*

*Mes remerciements s'adressent tout d'abord aux membres de l'équipe mito.*

*Jasmine, Josiane et Mr. Pétard, merci infiniment pour tous ces bons moments qu'on a partagé ensemble, au labo, en congrès, mais aussi ailleurs !*

*Jasmine, que dire de nos histoires en pièce bactério... et de toutes nos créations artistiques pour sublimer les manips ratées. Josiane, tu es ma compagne de route depuis le début et co-créatrice de Zébrou ! Je crois qu'en cette période d'attente pour toi, je peux encore placer mon fameux « l'inconnu implique le temps ». Eh oui c'est universel ! Mr. Pétard, merci de m'éviter d'être en contact avec tout élément rose du labo. Ce fut un plaisir de te transmettre mes aptitudes en Word, Excel et compagnie, mais n'oublie pas tout d'ici la rédaction de ta thèse !! Un grand merci pour votre soutien, pour avoir partagé ensemble les joies, les espérances, comme les déceptions. Bonne chance à vous !*

*Alice, merci pour ta bonne humeur et peut-être à bientôt dans un prochain spectacle mitochondrial. Camille, que la chance ne t'abandonne pas !! Metodi, welcome to the mito family, and good luck !*

*Agnès D., merci pour tes bons conseils et ton esprit critique. Valérie, merci pour ton expérience, tes encouragements, et pour ton aide que tu offres toujours si gentiment. Zarah, heureusement que tu viens squatter nos paillasses, c'est toujours un plaisir et une joie de pouvoir profiter de ton savoir et de ta gentillesse !*

*Un grand merci à toute l'équipe du 3<sup>e</sup> étage, Jean-Paul, Julie, Anne-Sophie, Coralie et Margot. Merci pour votre aide, votre apport et vos précieuses remarques pendant les réunions mito.*

*Catherine et Valérie, merci d'avoir expérimenté cette CGH custom et y avoir cru avec nous, malgré les faux espoirs des débuts.*

*Claude, merci pour m'avoir aidée et aiguillée dans l'utilisation des algorithmes de prédictions divers et variés.*

*Mario et Catherine, merci pour m'avoir coachée et aidée à gérer la paperasse pour la radioactivité.*

*Je remercie aussi tous les membres et amis de l'U781, Myriam, merci pour ta gentillesse et merci de toujours t'enquérir de mes avancées, merci à l'équipe œil et notamment Lucas pour tes conseils concernant la thèse. Merci à tous pour les échanges au quotidien, votre aide et votre soutien. Bon emménagement dans les magnifiques nouveaux locaux d'Imagine !*

*Je tiens enfin à remercier Sophie L. qui m'a encadrée lors de mon premier stage volontaire à Necker, alors que je n'étais qu'une toute petite L1. Tu as été mon premier contact avec la mitochondrie et a été à l'origine de mon retour pour cette thèse.*

*Je n'oublie pas la ménagerie de l'équipe : Zébrou et sa Zébrounette, Gino et surtout Ginette qui a grandement participé à mon défoulement nerveux.*

# SOMMAIRE

---

RESUME .....	7
INDEX DES FIGURES .....	8
INDEX DES TABLEAUX .....	11
ABREVIATIONS .....	12
INTRODUCTION .....	15
I. LA MITOCHONDRIE.....	17
1. Structure .....	17
2. Fonctions.....	18
a. La phosphorylation oxydative .....	18
b. Autres fonctions .....	20
II. LE GENOME MITOCHONDRIAL .....	22
1. Caractéristiques .....	22
2. Maintenance de l'ADNmt .....	24
a. Réplication mitochondriale .....	24
i. Protéines de la réplication mitochondriale.....	24
ii. Modèles de réplication de l'ADNmt.....	25
b. Réparation de l'ADNmt .....	27
3. Transcription mitochondriale .....	28
4. Traduction mitochondriale .....	30
a. Caractéristiques de la traduction mitochondriale.....	31
b. Initiation .....	33
c. Elongation.....	34
d. Terminaison.....	36
III. LES MALADIES MITOCHONDRIALES.....	38
1. Définition et prévalence .....	38
2. Hétérogénéité clinique et génétique .....	38
3. Diagnostic d'une maladie mitochondriale .....	39
a. Bilan métabolique .....	39
b. Enzymologie de la chaîne respiratoire .....	39
c. Diagnostic moléculaire .....	40
4. Maladies mitochondriales liées à une anomalie du génome mitochondrial .....	41
a. Anomalies qualitatives de l'ADNmt.....	42
b. Anomalies quantitatives de l'ADNmt .....	44
5. Maladies mitochondriales liées à une anomalie du génome nucléaire.....	44
a. Gènes de structure des sous-unités de la chaîne respiratoire .....	45
b. Gènes d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire .....	45
c. Gènes de maintenance de l'ADNmt .....	47
d. Gènes de synthèse du coenzyme Q.....	49
e. Traduction mitochondriale.....	50
6. Hétérogénéité des déficits multiples de la chaîne respiratoire .....	54
7. Les atteintes hépatiques mitochondriales.....	56
a. Etiologie des atteintes hépatiques mitochondriales .....	57
b. Les atteintes hépatiques mitochondriales .....	58
i. Les atteintes hépatiques mitochondriales avec déplétion de l'ADNmt .....	59
ii. Les atteintes hépatiques mitochondriales sans déplétion de l'ADNmt .....	60
IV. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE.....	61

<b>MATERIEL ET METHODES</b> .....	<b>63</b>
I. CULTURES CELLULAIRES.....	65
II. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE.....	65
1. Isolement des leucocytes à partir de prélèvements sanguins .....	65
2. Extraction d'ADN génomique à partir de leucocytes .....	65
3. Extraction d'ADN génomique à partir de fibroblastes .....	66
III. EXTRACTION D'ARN ET SYNTHÈSE D'ADNc.....	66
IV. RT-PCR QUANTITATIVE .....	67
V. PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION).....	68
VI. SEQUENÇAGE.....	68
VII. CARTOGRAPHIE GENETIQUE.....	69
VIII. SEQUENÇAGE HAUT DEBIT EXOME .....	70
IX. CGH (COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION) ARRAY .....	71
X. TRANSCRIPTOME .....	72
XI. TRANSFECTION DE FIBROBLASTES.....	74
XII. ETUDE <i>IN VITRO</i> DE LA TRADUCTION MITOCHONDRIALE .....	74
XIII. BN-PAGE .....	75
XIV. EXTRACTION DE PROTEINES ET SDS-PAGE .....	77
1. Extraction de protéines totales .....	77
2. Extraction de mitoplastes.....	77
3. Fractionnement cellulaire .....	77
4. SDS-PAGE .....	78
XV. ANALYSE <i>IN SILICO</i> .....	79
<b>RESULTATS</b> .....	<b>81</b>
COHORTE DE PATIENTS.....	83
I. <i>TRMU</i> , NOUVEAU GENE D'ATTEINTE HEPATIQUE MITOCHONDRIALE SANS DEPLETION DE L'ADNMT...93	93
1. Patients .....	93
2. Etude biochimique .....	95
3. Cartographie génétique .....	95
4. Impact des mutations dans <i>TRMU</i> sur la traduction mitochondriale .....	99
5. Conclusion .....	102
II. <i>TRMU</i> , <i>GFM1</i> , <i>TSFM</i> ET <i>LARS</i> NE SONT PAS DES GENES MAJEURS D'ATTEINTE HEPATIQUE MITOCHONDRIALE SANS DEPLETION DE L'ADNMT .....	111
1. Patients .....	111
2. Etude des gènes candidats.....	112
a. Gènes associés à une atteinte hépatique avec déplétion de l'ADNmt .....	112
i. DGUOK .....	112
ii. POLG.....	113
iii. MPV17 .....	113
iv. PEO1 .....	114
b. Gènes associés à une atteinte hépatique sans déplétion de l'ADNmt .....	114
i. GFM1 .....	114
ii. LARS.....	114
iii. TSFM.....	115
iv. TRMU.....	115
3. Conclusion .....	116
III. CARTOGRAPHIE GENETIQUE DANS DEUX FAMILLES D'ATTEINTE HEPATIQUE MITOCHONDRIALE SANS DEPLETION DE L'ADNMT.....	118

1. Famille KE .....	118
2. Famille CO .....	128
3. Conclusion .....	134
IV. HETEROGENEITE GENETIQUE DE LA COHORTE D'ATTEINTE HEPATIQUE SANS DEPLETION DE L'ADNMT : MOYENS D'ETUDE.....	136
1. Transcriptome .....	136
a. Approche gène candidat .....	137
b. Approche globale .....	137
2. Traduction mitochondriale .....	140
3. Séquençage haut débit exome .....	142
a. Familles KE et CO .....	142
b. Individu IA1.....	143
c. Autres patients présentant une atteinte hépatique .....	143
4. Conclusion.....	149
V. <i>NOX5</i> , NOUVEAU GENE D'ATTEINTE HEPATIQUE SANS DEPLETION DE L'ADNMT.....	152
1. Séquençage haut débit exome chez la patiente IA1 .....	152
a. Présentation clinique.....	152
b. Etude biochimique.....	153
c. Etude génétique : séquençage haut débit exome.....	154
2. Séquençage Sanger dans la cohorte d'atteinte hépatique mitochondriale .....	159
a. Présentation clinique des patients .....	160
b. Etude biochimique.....	161
c. Etude génétique .....	162
3. Expression du gène <i>NOX5</i> .....	165
a. Etude des transcrits .....	165
b. Etude de la protéine .....	166
4. Recherche d'un deuxième événement de mutation .....	168
a. Hypothèses .....	168
b. Empreinte génétique parentale .....	169
c. Séquençage de CNE (Conserved Noncoding Elements) .....	170
d. Séquençage des régions promotrice et de polyadénylation .....	172
e. Etude par CGH array enrichie .....	173
5. Validation de la mutation par sauvetage phénotypique .....	176
6. Etude fonctionnelle de la protéine <i>NOX5</i> .....	177
a. Localisation mitochondriale de la protéine <i>NOX5</i> .....	177
b. <i>NOX5</i> , acteur de la traduction mitochondriale ?.....	178
c. Impact des mutations <i>NOX5</i> sur le ribosome mitochondrial .....	179
7. Conclusion.....	182
VI. ANOMALIES DE TRADUCTION MITOCHONDRIALE .....	184
1. Mutations du gène <i>GFM1</i> .....	184
2. Mutations du gène <i>MRPL3</i> .....	184
<b>DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....</b>	<b>186</b>
I. EXCLUSION DES GENES CONNUS D'ATTEINTE HEPATIQUE .....	202
II. TRANSCRIPTOME.....	203
III. IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GENES D'ATTEINTE HEPATIQUE PAR SEQUENÇAGE HAUT DEBIT EXOME .....	203
IV. <i>NOX5</i> , UN NOUVEAU GENE D'ATTEINTE HEPATIQUE MITOCHONDRIALE ?.....	205
V. ATTEINTE HEPATIQUE MITOCHONDRIALE ET TISSU SPECIFICITE.....	208
VI. CONCLUSION .....	210
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....</b>	<b>213</b>





# RESUME

---

Les maladies mitochondriales sont les anomalies congénitales du métabolisme les plus fréquentes. Elles sont caractérisées par une très grande hétérogénéité clinique et génétique, et le gène responsable de la maladie n'a pu être identifié que pour seulement 30% d'entre elles.

Malgré l'hétérogénéité de ces maladies, il est possible d'identifier des groupes de patients cliniquement homogènes. C'est notamment le cas des atteintes hépatiques mitochondriales, qui peuvent se présenter sous une forme syndromique ou isolée. Les patients ayant une forme isolée ont soit une déplétion de l'ADNmt, soit une quantité d'ADNmt normale. Les patients avec déplétion de l'ADNmt sont très bien caractérisés génétiquement et sont mutés dans les gènes *DGUOK*, *POLG*, *PEO1* ou *MPV17*, alors que les atteintes hépatiques sans déplétion de l'ADNmt n'ont commencé à l'être que plus récemment et montrent une très grande hétérogénéité génétique.

Nous avons dans ce travail de recherche constitué une cohorte cliniquement homogène de 70 patients provenant des hôpitaux Necker-Enfants Malades et du Kremlin-Bicêtre présentant une atteinte hépatique mitochondriale isolée ou syndromique, sans déplétion de l'ADNmt, dont nous disposons de matériel (fibroblastes, ADN) nécessaire à leur étude.

Nous avons tout d'abord identifié des mutations dans le gène *TRMU*, codant pour une enzyme de modification des ARNt mitochondriaux, responsables d'une anomalie de la traduction mitochondriale. Nous avons par ailleurs établi l'hétérogénéité génétique de ce groupe de patients, puisque nous avons pu exclure la présence de mutations dans les gènes *TRMU*, *TSFM*, *GFM1* et *LARS* chez 40 patients, démontrant qu'il n'y a pas de gènes majeurs associés aux atteintes hépatiques sans déplétion de l'ADNmt. Pour deux familles multiplex pour lesquels l'ADN de plusieurs membres de la famille était disponible, nous avons réalisé une cartographie génétique combinée avec un séquençage exome et une étude du transcriptome, qui n'a pas permis de mettre en évidence de gène causal. Pour 38 autres patients, essentiellement des cas sporadiques, nous avons utilisé les stratégies du transcriptome et du séquençage exome, ce qui nous a permis d'identifier des variations robustes dans de nouveaux gènes *MRPS5*, *ALDH1B*, *NOX5*, *MTUS1*, *AARS2*, *PPA2*, *MTHFD1*, *ALDH6A1*, *NME4* et *GLDC* pour 17 patients. Enfin, nous avons étudié particulièrement les mutations identifiées dans le gène *NOX5*, retrouvées chez 3 patients de la cohorte. Ce gène code pour une protéine NADPH de fonction inconnue, que nous pensons être impliquée dans la traduction mitochondriale.

Mots clés : Mitochondrie, atteinte hépatique, traduction mitochondriale

# INDEX DES FIGURES

---

Figure 1 : Image d'une mitochondrie en microscopie électronique à balayage.....	17
Figure 2 : Schéma des sous-unités constitutives de la chaîne respiratoire mitochondriale. ....	19
Figure 3 : Schéma récapitulatif des fonctions importantes de la mitochondrie.....	21
Figure 4 : Structure de l'ADN mitochondrial.....	22
Figure 5 : Voies de synthèse des dNTP cytosoliques et mitochondriaux (Rotig and Poulton 2009).....	24
Figure 6 : Modèle asynchrone de la réplication de l'ADNmt. ....	25
Figure 7 : Réplication couplée des deux brins d'ADNmt.....	26
Figure 8 : Modèle des RITOLS de la réplication de l'ADNmt. ....	27
Figure 9 : Schéma de la transcription mitochondriale (Litonin, Sologub et al. 2010).....	29
Figure 10 : Schéma des acteurs impliqués dans l'intégration des protéines mitochondriales dans la membrane interne mitochondriale (Kim, Kwon et al. 2012). ....	33
Figure 11 : Schéma de l'initiation de la traduction mitochondriale (Christian and Spremulli 2012). ....	34
Figure 12 : Schéma de l'élongation de la traduction mitochondriale (Christian and Spremulli 2012). ....	35
Figure 13 : Schéma de la terminaison de la traduction mitochondriale (Christian and Spremulli 2012). ....	37
Figure 14 : Ségrégation mitotique et hétéroplasmie. ....	42
Figure 15 : Délétions de l'ADNmt. ....	43
Figure 16 : Gènes impliqués dans les syndromes de déplétion de l'ADNmt (Suomalainen and Isohanni 2010)...	49
Figure 17 : Répartition des atteintes hépatiques mitochondriales isolées et syndromiques parmi notre cohorte de patients de l'hôpital Necker-Enfants Malades. ....	59
Figure 18 : Arbre généalogique de la famille AH. ....	93
Figure 19 : Arbre généalogique de la famille AZ. ....	94
Figure 20 : BN-PAGE réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes des patients AH1 et AZ1 des familles AH et AZ et un contrôle (C). ....	95
Figure 21 : Représentation schématique de la fonction de la protéine TRMU (à gauche) et modification assurée par TRMU sur l'ARNt <sup>Lys</sup> mitochondrial (à droite). ....	97
Figure 22 : Séquence du gène <i>TRMU</i> chez les patients AH1 et AZ1, montrant la substitution homozygote c.2T>A dans l'exon 1. ....	98
Figure 23 : Mutations identifiées dans le gène <i>TRMU</i> . ....	99
Figure 24 : Etude de la traduction mitochondriale <i>in vitro</i> par marquage à la méthionine <sup>35</sup> S dans les fibroblastes des patients 2, 3 et 4 par rapport à un contrôle 1. ....	100
Figure 25 : Analyse de la 2-thiolation des ARNt mitochondriaux modifiés par TRMU. ....	101
Figure 26 : Arbre généalogique de la famille KE. ....	118
Figure 27 : BN-PAGE réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes des patients de la famille KE et d'un contrôle. ....	120
Figure 28 : Arbre généalogique de la famille CO. ....	128
Figure 29 : BN-PAGE réalisé sur des mitoplastes extraits de fibroblastes des patientes de la famille CO. ....	129

Figure 30 : Modification d'expression des ARNt synthétases mitochondriales chez les patients 1 à 16. ....	139
Figure 31 : Clustering non supervisé réalisé sur l'ensemble des sondes du transcriptome pour les 16 patients. ....	140
Figure 32 : SDS-PAGE réalisé à partir de mitoplastes extraits de fibroblastes des patients 10, 11, 12, 13, 14 et 15 et d'un contrôle. ....	141
Figure 33 : Etude de la traduction <i>in vitro</i> par marquage à la méthionine <sup>35</sup> S des protéines codées par l'ADNmt sur des fibroblastes des patients 10, 11, 12, 13, 14, 15 et d'un contrôle. ....	142
Figure 34 : Arbre généalogique de la famille IA. ....	152
Figure 35 : BN-PAGE réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes de la patiente IA1 et d'un contrôle. ....	153
Figure 36 : A gauche, représentation schématique des isoformes de la protéine NOX5. A droite, scores de prédiction d'adressage mitochondrial pour les 5 isoformes de la protéine NOX5. ....	155
Figure 37 : Représentation schématique de l'isoforme la plus longue (Y) de la protéine NOX5. ....	155
Figure 38 : Haut : Séquences du gène <i>NOX5</i> montrant la substitution c.1336 G>A transmise par le père IA, et la néo-mutation c.1648-3 C>T chez l'enfant IA1. Bas : Conservation de la Valine 446 et des acides aminés de l'exon 13 entre différents orthologues de NOX5 et les différentes protéines de la famille NOX. ....	157
Figure 39 : A gauche : Structure d'une partie du gène <i>NOX5</i> . A droite : Electrophorèse des produits de RT-PCR réalisée sur les ARN extraits de fibroblastes de la patiente IA1 et d'un contrôle (C). ....	158
Figure 40 : Séquences des deux espèces d'ARNm <i>NOX5</i> de la patiente IA1. ....	159
Figure 41 : Arbre généalogique de la famille TO. ....	160
Figure 42 : Arbre généalogique de la famille BI. ....	160
Figure 43 : BN-PAGE réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes des patients BI1 et TO1. ....	161
Figure 44 : Haut : Séquences du gène <i>NOX5</i> montrant la délétion p.K732del retrouvée à l'état hétérozygote chez le patient BI1 et transmise par sa mère. Bas : Conservation de la Lysine 732 entre des orthologues de <i>NOX5</i> . ....	162
Figure 45 : Haut : Séquences du gène <i>NOX5</i> montrant la substitution p.T299M chez le patient TO1 transmise par sa mère. Bas : Conservation de la Thréonine 299 entre des orthologues de <i>NOX5</i> . ....	163
Figure 46 : Séquences de l'ADNg et de l'ADNc <i>NOX5</i> montrant la présence de la délétion p.K732del chez la patiente BI1. ....	164
Figure 47 : Séquences de l'ADNg et de l'ADNc <i>NOX5</i> montrant l'absence de la substitution p.T299M sur l'ADNc (normal et traité avec de la puromycine) du patient TO1. ....	165
Figure 48 : Electrophorèse des produits de RT-PCR réalisée sur les ARN extraits de fibroblastes des patients TO1, BI1 et IA1 et d'un contrôle (C). ....	166
Figure 49 : Localisation des mutations identifiées dans le gène <i>NOX5</i> . ....	167
Figure 50 : SDS-PAGE montrant l'expression de la protéine <i>NOX5</i> , réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes des patients IA1, TO1 et BI1. ....	168
Figure 51 : Schéma récapitulatif des mutations identifiées dans le gène <i>NOX5</i> et de leur ségrégation dans les trois familles IA, BI et TO. ....	169
Figure 52 : Electrophorèse des produits de RT-PCR <i>NOX5</i> réalisée sur les ARN extraits de fibroblastes des patients IA1, BI1, BI père et BI mère et d'un contrôle (C). ....	172
Figure 53 : Profil de la CGH array 244K pour la région génomique du gène <i>NOX5</i> pour les individus BI père, BI mère, TO père, TO mère, IA1, IA mère, IA père. ....	174
Figure 54 : Profil de la CGH array 180K custom pour la région génomique du gène <i>NOX5</i> pour les individus BI père, BI mère, TO père, TO mère, IA1, IA mère, IA père. ....	175

Figure 55 : BN-PAGE réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes (Fb), de fibroblastes immortalisés par l'antigène T de SV40 (Fb SV40) et de fibroblastes SV40 transfectés par le vecteur d'expression pCDNA3.1A contenant l'ADNc sauvage de NOX5 entier (NOX5 FL) ou l'ADNc de NOX5 forme mitochondriale (NOX5 mt).....	176
Figure 56 : SDS-PAGE montrant la localisation cellulaire de NOX5, réalisé sur des fractions cellulaires (cytoplasme, mitochondries, extrait total de protéines) de fibroblastes contrôles. ....	177
Figure 57 : BN-PAGE réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes des patients mutés dans les gènes <i>GFM1</i> , <i>MRPL3</i> et <i>TSM</i> comparé au BN-PAGE de la patiente IA1. ....	178
Figure 58 : Etude de la traduction <i>in vitro</i> par marquage à la méthionine <sup>35</sup> S des protéines codées par l'ADNmt sur des fibroblastes du patient IA1 et d'un contrôle. ....	179
Figure 59 : Quantification par qPCR de l'expression relative des ARNr mitochondriaux 12S et 16S pour la patiente IA1 (vert clair) par rapport à un contrôle C (vert foncé).....	180
Figure 60 : Quantification par qPCR de l'expression relative des ARNr mitochondriaux 12S et 16S des fibroblastes de la patiente IA1 transfectés par le vecteur d'expression pCDNA3.1 contenant [NOX5FL] ou [NOX5mt], par rapport à un contrôle C. ....	180
Figure 61 : SDS-PAGE montrant l'expression des protéines ribosomales MRPL3 et MRPS25, réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes de IA1 et d'un contrôle. ....	181
Figure 62 : Répartition des patients de l'hôpital Necker-Enfants Malades en fonction du type de déficit et caractérisation génétique de ces déficits.....	201
Figure 63 : Répartition des gènes mutés identifiés chez nos patients des hôpitaux Necker-Enfants Malades et du Kremlin-Bicêtre ayant une atteinte hépatique mitochondriale.....	211

# INDEX DES TABLEAUX

---

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques, enzymologiques et en Western-Blot observées en association avec les mutations identifiées dans les gènes nucléaires de la traduction mitochondriale. ....	55
Tableau 2 : Caractéristiques des différents types d'atteintes hépatiques mitochondriales. ....	57
Tableau 3 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCRq des ADNc actine, ARNr 12S et ARNr16S. ....	67
Tableau 4 : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients présentant une atteinte hépatique. ....	92
Tableau 5 : Régions d'homozygotie pour la famille AZ obtenues grâce au génotypage DeCODE réalisé sur les enfants atteints AZ1 et AZ2. ....	96
Tableau 6 : Régions d'homozygotie pour la famille AH obtenues grâce au génotypage DeCODE réalisé sur les enfants atteints AH1 et AH2. ....	96
Tableau 7 : Régions d'homozygotie communes entre les familles AH et AZ. ....	97
Tableau 8 : Régions d'homozygotie pour la famille KE obtenues grâce au génotypage 10K réalisé sur les enfants atteints KE1 et KE2 et les parents. ....	121
Tableau 9 : Régions d'homozygotie pour la famille KE obtenues en couplant le génotypage 10K (sans KE3) et le génotypage 250K réalisé sur l'enfant KE3. ....	121
Tableau 10 : Nouvelles régions d'homozygotie obtenues grâce aux données de l'exome pour la famille KE. ...	124
Tableau 11 : Gènes séquencés et exclus pour la famille KE. ....	127
Tableau 12 : Régions d'haploidentité obtenues par le génotypage 10K réalisé pour l'ensemble des individus de la famille CO. ....	130
Tableau 13 : Régions d'haploidentité pour la famille CO obtenues en couplant les données du génotypage 10K et du séquençage haut débit exome. ....	132
Tableau 14 : Gènes séquencés et exclus pour la famille CO. ....	133
Tableau 15 : Variations identifiées par séquençage haut débit exome. ....	145
Tableau 16 : Résumé des variations détectées par l'analyse de l'exome du patient IA1. ....	154

# ABREVIATIONS

---

Acétyl-CoA	Acétyl coenzyme A
ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ADNmt	Acide désoxyribonucléique mitochondrial
ADNn	Acide désoxyribonucléique nucléaire
ADP	Adénosine diphosphate
ALAT	Alanine aminotransférase
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
ARNr	Acide ribonucléique ribosomique
ARNt	Acide ribonucléique de transfert
ARSAL	<i>Autosomal Recessive Spastic Ataxia with Leukoencephalopathy</i>
ASAT	Aspartate aminotransférase
ATP	adénosine triphosphate
ATPase	ATP synthétase
BER	<i>Base Excision Repair</i>
BN-PAGE	<i>Blue Native- Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
CI	Complexe I, NADH-ubiquinone réductase
CII	Complexe II, succinate-ubiquinone réductase
CIII	Complexe III, ubiquinone-cytochrome <i>c</i> réductase
CIV	Complexe IV, cytochrome <i>c</i> oxydase
CV	Complexe V, ATP synthase
CGH	<i>Comparative Genomic Hybridization</i>
CNE	<i>Conserved Noncoding Elements</i>
CNV	<i>Copy Number Variation</i>
CoQ	Coenzyme Q
COX	Cytochrome <i>c</i> oxydase
Cyt	Cytochrome
ddNTP	Didésoxynucléotide triphosphate
DMEM	<i>Dubelcco's Modified Eagle's Medium</i>

ECL	Electrochimiluminescence
EDTA	Ethylène diamine tétraacétique
EFG1	<i>Elongation factor G1</i>
EFTs	<i>Elongation factor thermo stable</i>
EFTu	<i>Elongation factor thermo unstable</i>
FAD	Flavine adénine dinucléotide (forme oxydée)
FADH <sub>2</sub>	Flavine adénine dinucléotide (forme réduite)
FL	<i>Full lenght</i>
γGT	Gamma-Glutamyl-Transpeptidase
HRP	<i>Horseradish peroxydase</i>
HSP	<i>Heavy Strand Promoter</i>
HUPRA	<i>Hyperuricemia, Pulmonary hypertension, Renal Failure in infancy and Alkalosis</i>
KSS	<i>Kearn-Sayre Syndrom</i>
LHON	<i>Leber Hereditary Optic Neuropathy</i>
LSP	<i>Light Strand Promoter</i>
MELAS	<i>Myopathy-Encephalopathy-Lactic Acidosis-Stroke like episodes</i>
MERFF	<i>Myoclonic Epilepsy-Ragged Red Fibers</i>
MLASA	<i>Myopathy, Lactic Acidosis and Sideroblastic Anemia</i>
MM	Mis-Match
MNGIE	<i>Mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy</i>
MOPS	<i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
MRP	<i>Mitochondrial Ribosomal Protein</i>
mTERF	<i>Mitochondrial Transcription Termination Factor</i>
mtRF	<i>Mitochondrial Release Factor</i>
mtRRF	<i>Mitochondrial Ribosomal Recycling Factor</i>
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamide adénine dinucléotide (forme réduite)
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide (forme oxydée)
NADPH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide Phosphate (forme réduite)
NARP	<i>Neurogenic Ataxia-Retinis Pigmentosa</i>
NER	<i>Nucleotide Excision Repair</i>
O <sub>H</sub>	Origine de répliation du brin lourd
O <sub>L</sub>	Origine de répliation du brin léger
OXPHOS	Phosphorylation oxydative
PAL	Phosphatases alcalines
pb	Paire de bases



PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PEO	<i>Progressive External Ophtalmoplegia</i>
PIC	<i>Proteinase Inhibitor Cocktail</i>
POLG	ADN polymérase mitochondriale gamma
PM	Perfect Match
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
qPCR	<i>Quantitative polymerase chain reaction</i>
RCIU	Retard de croissance intra-utérin
RITOLS	<i>Ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand</i>
SDH	Succinate déshydrogénase
SDS	Sodium dodécyl sulfate
SDS-PAGE	<i>Sodium Dodecyl sulfate-Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SUCL	Succinyl-CoA ligase
TBE	Tris borate-EDTA
TK	Thymidine kinase
TFBS	<i>Transcription Factor Binding Site</i>

# *INTRODUCTION*

---

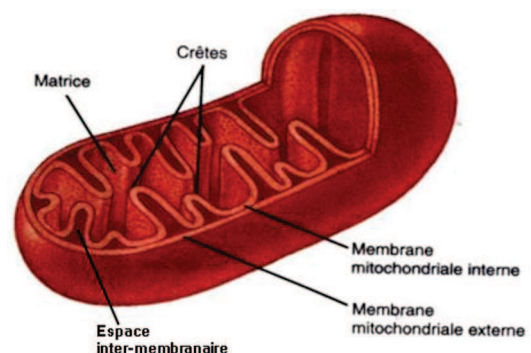


# I. LA MITOCHONDRIE

## 1. Structure

La mitochondrie est un organe cytosolique présent dans les cellules eucaryotes, d'environ 1  $\mu\text{m}$  de diamètre sur 3-4  $\mu\text{m}$  de long, dont la taille et la forme rappellent celles d'une bactérie. Cet organe essentiel à la production d'énergie est présent dans l'ensemble des types cellulaires d'un organisme (excepté les hématies). Le nombre de mitochondries par cellule est très variable, de un à plusieurs milliers selon le tissu. En effet, les tissus neurologiques, musculaires et cardiaques, plus nécessitent en énergie, possèdent beaucoup plus de mitochondries par cellule. Le nombre de mitochondries par cellule peut également varier selon les besoins énergétiques des cellules. Par exemple, un muscle squelettique peut augmenter de cinq à dix fois sa masse mitochondriale lorsqu'il passe du repos à un effort nécessitant une stimulation intense.

Ces organites particuliers forment un réseau dynamique complexe au niveau du cytoplasme de chaque cellule, à l'exception des hématies. Ce réseau est en constant équilibre entre une forme dite granuleuse et une autre qualifiée de filamenteuse. Ce remodelage continu est régi par deux mécanismes qui sont la fusion, à l'origine de l'état filamenteux, et la fission, entraînant la formation d'un réseau fragmenté. Grâce à cet équilibre entre fusion et fission, les mitochondries peuvent s'adapter aux différentes conditions cellulaires (différenciation, apoptose). Ce réseau dynamique contribue au déplacement des mitochondries dans le cytosol le long des microtubules cellulaires (Liesa, Palacin et al. 2009).



**Figure 1 : Structure d'une mitochondrie.**

*A gauche : mitochondrie observée en microscopie électronique à balayage. A droite : schéma structurale d'une mitochondrie.*

La mitochondrie est constituée de deux membranes lipidiques : la membrane externe et la membrane interne, qui compartimentent la mitochondrie en deux espaces distincts : l'espace inter-membranaire entre les deux membranes, et la matrice mitochondriale délimitée par la membrane interne (Figure 1). Cette compartimentation est essentielle au fonctionnement de la mitochondrie.

La membrane externe est le lieu d'échange entre la mitochondrie et le cytosol. Elle comporte de nombreux transporteurs et des canaux de porine, qui la rendent très perméable aux ions et aux petites molécules (<10 kDa).

L'espace inter-membranaire a une composition assez proche de celle du cytosol, plus proche que celle de la matrice mitochondriale. Ceci est dû à la grande perméabilité de la membrane externe ainsi qu'à l'imperméabilité aux ions de la membrane interne, causée par la présence de phosphatidylcholine et de cardiolipine.

La membrane interne a une surface beaucoup plus étendue que celle de la membrane externe, car elle forme de nombreux replis constituant des crêtes mitochondriales. Au sein de cette membrane interne se trouvent les différents complexes protéiques responsables de la phosphorylation oxydative, qui est le lieu de la production d'ATP.

La matrice mitochondriale contient des enzymes impliquées dans des processus autres que la phosphorylation oxydative, tels que le cycle de Krebs, l'oxydation du pyruvate, ou encore le métabolisme des acides gras et des acides aminés. La matrice renferme également l'ADN mitochondrial (ADNmt), qui possède quelques particularités. Cet ADN circulaire double brin d'environ 16 kb est présent en plusieurs copies au sein d'une même mitochondrie. La mitochondrie est le seul organite intracellulaire à disposer de son propre ADN et de sa machinerie de réplication, de transcription et de traduction.

## **2. Fonctions**

### **a. La phosphorylation oxydative**

La mitochondrie joue un rôle central dans le métabolisme énergétique cellulaire, car elle est le siège du catabolisme oxydatif qui aboutit à la production d'énergie sous forme d'ATP (Hatefi 1985).

La majeure partie de l'énergie nécessaire aux cellules est générée par les mitochondries à travers la phosphorylation oxydative (OXPHOS), processus couplant la réoxydation des coenzymes réduits (NADH et  $\text{FADH}_2$ ) libérés lors de la glycolyse et du cycle de Krebs, et la synthèse d'ATP par phosphorylation de l'ADP. Celle-ci a lieu au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale, qui est constituée de quatre complexes protéiques multimériques localisés au sein de la membrane interne mitochondriale :

- Le complexe I (NADH ubiquinone oxydoréductase), constitué de 46 sous-unités protéiques,
- Le complexe II (succinate ubiquinone oxydoréductase), constitué de 4 sous-unités,
- Le complexe III (ubiquinol cytochrome c réductase), constitué de 11 sous-unités,
- Le complexe IV (cytochrome c oxydase), constitué de 13 sous-unités,

Enfin, le complexe V (ATP synthétase) est constitué de 16 sous-unités.

La chaîne respiratoire comporte également deux petites molécules mobiles, l'ubiquinone (ou coenzyme  $\text{Q}_{10}$ ) et le cytochrome c, assurant le transport des électrons entre les différents complexes (Figure 2).

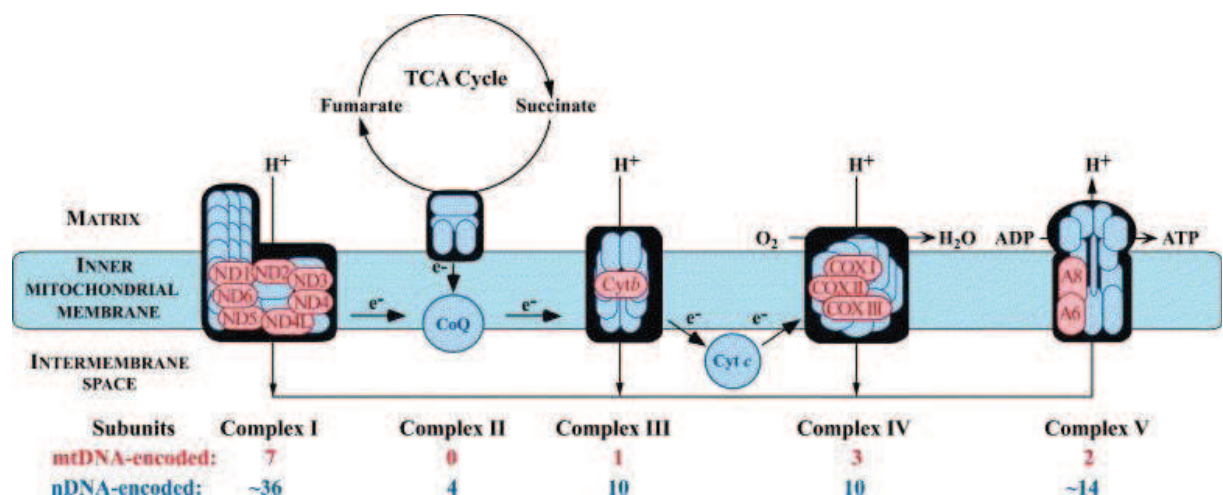


Figure 2 : Schéma des sous-unités constitutives de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Les sous-unités codées par l'ADN nucléaire (ADNn) sont figurées en bleu et celles codées par l'ADN mitochondrial (ADNmt) en rouge. Figurent également les électrons ( $e^-$ ) transportés le long de la chaîne respiratoire, s'accompagnant de l'expulsion de protons ( $\text{H}^+$ ) de la matrice vers l'espace intermembranaire par les complexes I, III et IV. Le gradient électrochimique ainsi créé permet la production d'ATP par le complexe V via la sortie des protons vers la matrice. Le coenzyme Q (CoQ) et le cytochrome c (Cyt c) sont des transporteurs d'électrons (DiMauro 2004).

La réaction de phosphorylation oxydative se fait grâce au transfert des électrons fournis par les coenzymes réduits (NADH et FADH<sub>2</sub>), des complexes I à IV par l'intermédiaire de transporteurs rédox. Les électrons fournis par le NADH entrent dans la chaîne respiratoire au niveau du complexe I et ceux fournis par le FADH<sub>2</sub> au niveau du complexe II. Les électrons passent successivement d'un complexe à l'autre, chaque complexe présentant une plus grande affinité pour les électrons que le précédent. De petits transporteurs mobiles d'électrons assurent la liaison entre les quatre complexes enzymatiques : l'ubiquinone (coenzyme Q) fait lien entre les complexes I et II et le complexe III, et le cytochrome c entre les complexes III et IV. L'accepteur final d'électron est l'oxygène moléculaire O<sub>2</sub>, qui est réduit en eau, H<sub>2</sub>O.

Ce transfert des électrons le long de la chaîne respiratoire est couplé à une translocation de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire. Cette translocation intervient au niveau des complexes I, III et IV. La membrane mitochondriale interne étant imperméable à ces protons, la concentration en protons devient plus élevée dans l'espace inter-membranaire, ce qui crée un gradient de protons, donc de pH et donc de potentiel. Il s'agit du potentiel électrochimique.

La création de ce potentiel électrochimique va alors permettre le fonctionnement du cinquième complexe enzymatique, l'ATP synthase, qui grâce à son canal à protons, permet le retour des protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice mitochondriale. L'énergie de ce flux de protons, à savoir la force motrice, permet alors à l'ATP synthase de fonctionner en synthétisant de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Le rendement est d'environ 2,5 molécules d'ATP par paire d'électrons issus du NADH et 1,5 molécule d'ATP par paire d'électrons provenant du FADH<sub>2</sub>.

### **b. Autres fonctions**

Les mitochondries sont le siège de nombreuses réactions du catabolisme cellulaire telles que la β-oxydation des acides gras, le cycle de Krebs et le cycle de l'urée (Figure 3). La β-oxydation des acides gras, dont la majorité des étapes se déroule dans la matrice mitochondriale, est une source majeure d'énergie grâce à son importante production d'acétyl-CoA, qui est directement utilisé par le cycle de Krebs comme première source d'énergie.

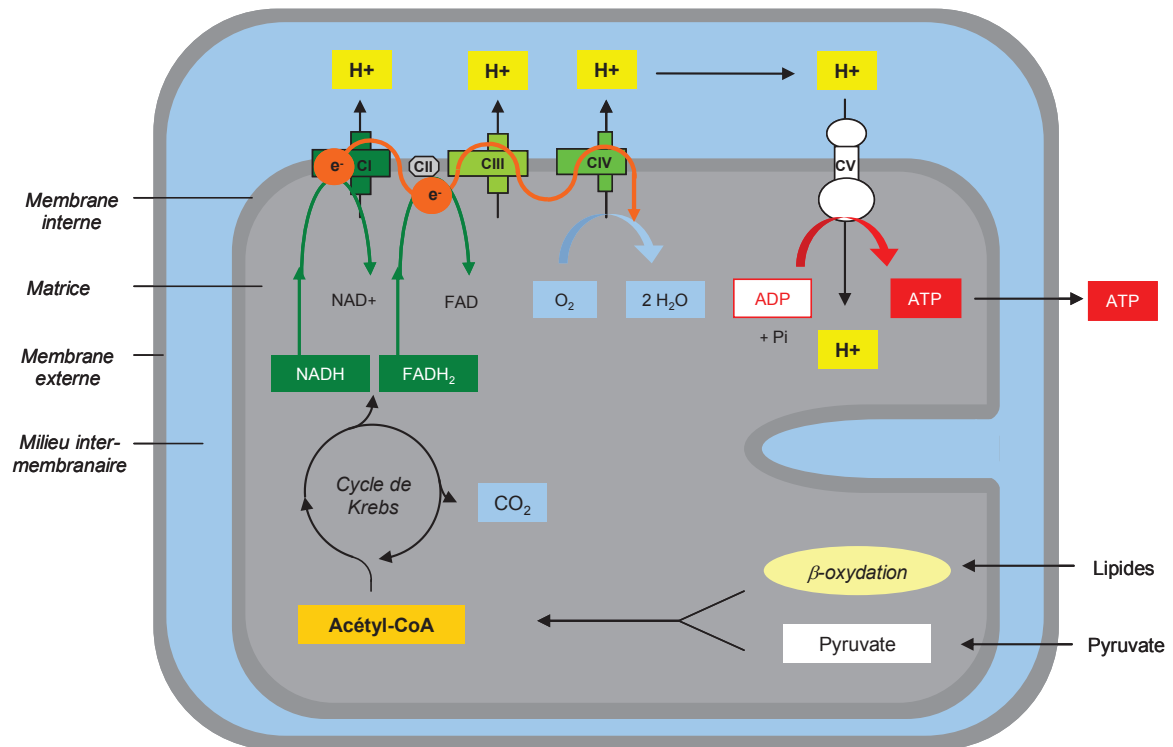


Figure 3 : Schéma récapitulatif des fonctions importantes de la mitochondrie.

La mitochondrie présente un rôle majeur dans la mort cellulaire programmée ou apoptose. Elle intervient dans ce processus principalement grâce aux protéines de la famille Bcl2 et des caspases, mais également par fuite de cytochrome *c* dans le cytoplasme (Loeffler and Kroemer 2000) ou encore grâce à des protéines bifonctionnelles, comme les protéines ribosomales mitochondriales MRPS29/DAP3 (*Death Associated Protein 3*), MRPS30/PDCD9 (*Programmed Cell Death Protein 9*) (O'Brien 2002; Borutaite 2010; Sheridan and Martin 2010).

Elle entre en compte également dans l'homéostasie de plusieurs ions comme le calcium, le cuivre et le fer, la synthèse de stéroïdes hormonaux et le renouvellement des monoamines (neurotransmetteurs). Elle protège aussi la cellule contre les radicaux libres.

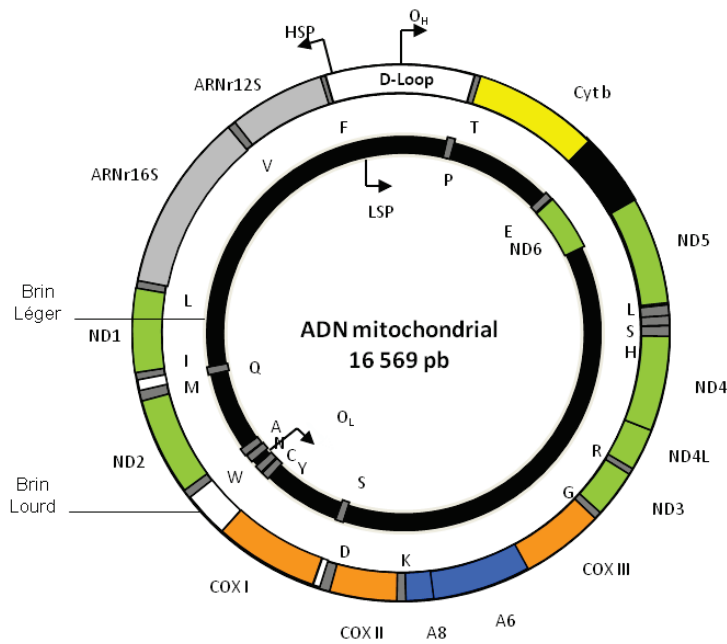


## II. LE GENOME MITOCHONDRIAL

### 1. Caractéristiques

La mitochondrie est le seul organe possédant sa propre information génétique : une molécule d'ADN circulaire double brin présente en plusieurs copies au sein de la matrice mitochondriale. Chez l'Homme, cette molécule fait 16569 paires de bases.

L'ADNmt comporte 37 gènes : 13 codant pour des protéines des différents complexes de la chaîne respiratoire (à l'exception du complexe II), ainsi que 22 gènes codant pour des ARN de transfert (ARNt) et 2 pour des ARN ribosomiaux (ARNr) nécessaires à sa propre machinerie de traduction (Figure 4).



**Figure 4 : Structure de l'ADN mitochondrial.**

*D-loop* : boucle de déplacement, *OH*, *OL* : origine de réplication du brin lourd et du brin léger ; *ND1*, *ND2*, *ND3*, *ND4*, *ND4L*, *ND5*, *ND6* : NADH déshydrogénase 1-6 (complexe I) ; *cyt b* : cytochrome b (complexe III) ; *COX I*, *COX II*, *COX III* : cytochrome c oxydase I à III (complexe IV) ; *ATPase 6*, *ATPase 8* (complexe V). Les traits gris représentent les 22 ARNt.

Les deux brins de l'ADNmt sont différents : on distingue un brin lourd « H » (*Heavy*) et un brin léger « L » (*Light*). Le brin H porte la majorité des gènes : 12 sous-unités des complexes respiratoires, les 2 ARNr 12S et 16S ainsi que 14 ARNt. Seule la sous-unité ND6 du complexe I et 8 gènes d'ARNt sont codés par le brin L.

L'ADNmt est organisé de manière extrêmement compacte et présente deux chevauchements de cadre de lecture entre les gènes codant pour l'ATPase : *ATP8* et *ATP6*, et entre les gènes *ND4* et *ND4L*. Il possède seulement une région non codante d'environ 1 kb appelée D-loop (*Displacement loop*), qui contient les séquences nécessaires à l'initiation de la réplication et de la transcription de l'ADNmt (Figure 4).

Le génome mitochondrial diffère du génome nucléaire au niveau du code génétique universel. Le codon UGA code pour le tryptophane au lieu d'être un codon stop. AUA code pour la méthionine et non l'isoleucine. On dénombre donc 2 codons start (AUA en plus de AUG) et 2 codons stop (UAA et UAG) dans la mitochondrie.

Le mode de transmission de l'ADNmt n'est pas mendélien mais maternel. En effet, toutes les mitochondries de la cellule œuf proviennent de l'ovule, les mitochondries du flagelle du spermatozoïde ayant été dégradées au moment de la fécondation. L'ADNmt est donc transmis exclusivement par la mère. Toutefois, un rare cas de transmission d'origine paternelle de l'ADNmt a déjà été rapporté (Gustafson 2002; Heckerling 2002; Schwartz and Vissing 2002).

Dans la matrice mitochondriale, les molécules d'ADNmt sont associées au sein de complexes nucléoprotéiques appelés nucléoïdes. Chez l'homme, on compte de 2 à 10 copies d'ADNmt par nucléoïde et une trentaine de protéines associées à cette structure. Les nucléoïdes permettent la compaction et la protection de l'ADNmt et aident à sa ségrégation au cours de la biogenèse mitochondriale (Chen, Wang et al. 2005). Les protéines du nucléoïde sont ainsi impliquées dans la maintenance, la réplication ou la transcription de l'ADNmt (en particulier TFAM, mtSSB et Twinkle), mais aussi dans la traduction mitochondriale. En effet, récemment l'interaction de la protéine C4orf14 avec le nucléoïde et des facteurs de traduction mitochondriaux a été démontrée, suggérant que la petite sous-unité du ribosome mitochondrial 28S est assemblée dans le nucléoïde, ce qui permet le transfert direct de l'ARNm du nucléoïde au ribosome (He, Cooper et al. 2012).

Les fonctions des différentes protéines du nucléoïde seraient liées à leur localisation au sein du nucléoïde. En son cœur se situeraient les protéines de la transcription et de la réplication de l'ADNmt, alors que les protéines impliquées dans la maturation des ARN, la traduction et l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire se situeraient à la périphérie du nucléoïde (Bogehagen, Rousseau et al. 2008).

## 2. Maintenance de l'ADNmt

### a. Réplication mitochondriale

#### i. Protéines de la réplication mitochondriale

Pour maintenir son information génétique, l'ADNmt se réplique de façon continue, que ce soit lors de la prolifération des mitochondries ou lors de la division cellulaire. La réplication de l'ADNmt a même lieu dans les cellules post-mitotiques qui ne se divisent plus (les neurones et les myocytes), ce qui implique qu'elle se fasse indépendamment du cycle cellulaire et de la réplication de l'ADN nucléaire (ADNn) (Shadel and Clayton 1997).

La machinerie de réplication de l'ADNmt fait intervenir l'ADN polymérase gamma mitochondriale (POLG), l'hélicase Twinkle et la protéine mtSSB (*mitochondrial single-strand binding protein*) qui recouvre l'ADNmt afin de maintenir la structure en simple brin. Un apport de désoxynucléotides tri-phosphates (dNTP) est également indispensable à la synthèse de l'ADN, ces derniers en constituant les éléments de base (Rotig and Poulton 2009). Or il n'existe pas de synthèse de novo des dNTP dans la mitochondrie. Celle-ci est donc dépendante de l'apport cytosolique de dNTP, soit grâce à l'import de nucléotides par des transporteurs spécifiques, soit par la voie mitochondriale de récupération des dNTP (Figure 5).

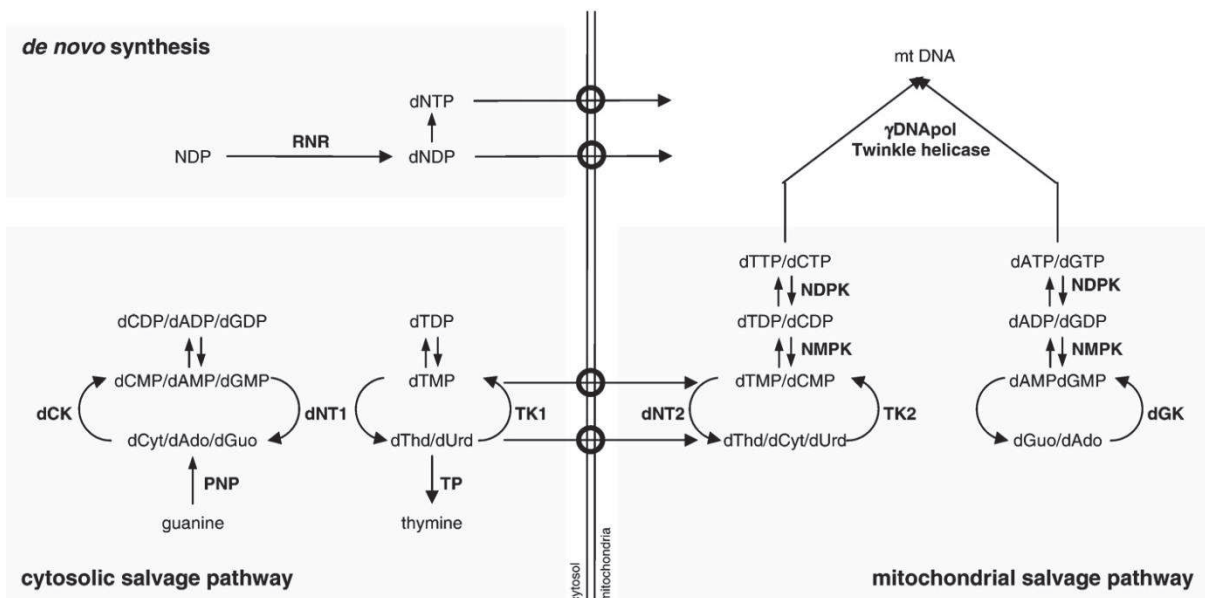


Figure 5 : Voies de synthèse des dNTP cytosoliques et mitochondriaux (Rotig and Poulton 2009).

Les enzymes mitochondriales impliquées dans cette voie de récupération des dNTP sont d'une part des désoxyribonucléotides kinases ou dNK dont la déoxyguanosine kinase dGK (codée par le gène *DGUOK*) et la thymidine kinase (codée par le gène *TK2*). Les autres enzymes impliquées sont des nucléotides monophosphate kinases NMPK et des nucléotides diphosphate kinases NDPK.

## ii. Modèles de réplication de l'ADNmt

Plusieurs modèles tentent d'expliquer le mécanisme de la réplication de l'ADNmt.

Le premier à avoir été proposé en 1972 est le modèle de réplication asynchrone (Robberson and Clayton 1972). Chaque brin d'ADNmt a une origine de réplication distincte :  $O_H$  pour le brin lourd (H) et  $O_L$  pour le brin léger (L). La réplication débute avec celle du brin H au niveau de l'origine  $O_H$  (Figure 6). La synthèse du brin lourd se fait sur les deux tiers du génome mitochondrial, jusqu'à ce que la fourche de réplication arrive à l'origine  $O_L$ . La réplication du brin L est alors immédiatement initiée, dans la direction opposée à celle du brin H. Le brin lourd est donc synthétisé avant le brin léger. Une fois la réplication des deux brins terminée, leurs extrémités libres sont liées par une ligase et une gyrase assure leur enroulement, ce qui leur permet de retrouver une structure super-enroulée caractéristique.

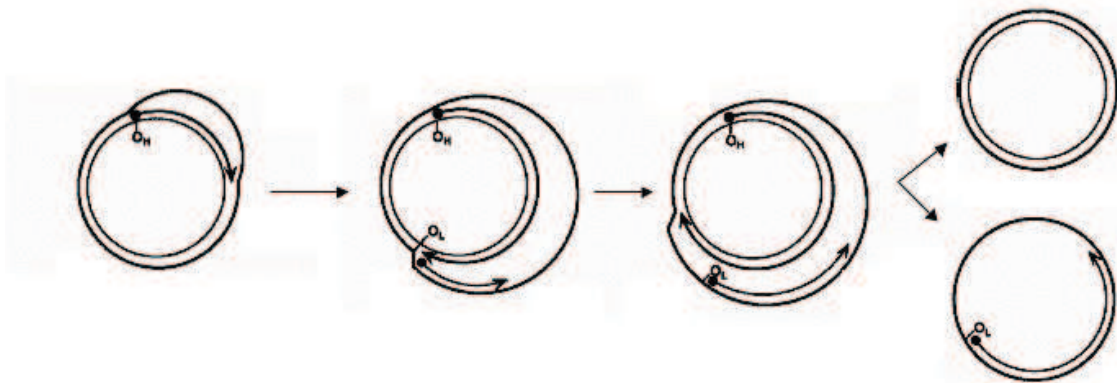


Figure 6 : Modèle asynchrone de la réplication de l'ADNmt.

Cependant, la présence d'intermédiaires de réplication double brin a été mise en évidence, ce qui n'est pas compatible avec ce modèle (Brown, Cecconi et al. 2005).

D'autres modèles de réplication couplée ont alors été proposés.

Le modèle de réplication couplée conventionnelle (Holt, Lorimer et al. 2000) propose qu'il y ait plusieurs origines de réplication situées dans une large région appelée Ori-Z, comportant les gènes codant pour le cytochrome *b* et les sous-unités ND5 et ND6, localisées près de l'origine  $O_H$  (Figure 7). D'après ce modèle, la synthèse est tout d'abord bidirectionnelle et implique la formation de fragments d'Okazaki. Puis, lorsque la fourche de réplication arrive au niveau de l'origine  $O_H$ , la réplication se poursuit de manière unidirectionnelle (Holt, Lorimer et al. 2000; Bowmaker, Yang et al. 2003).

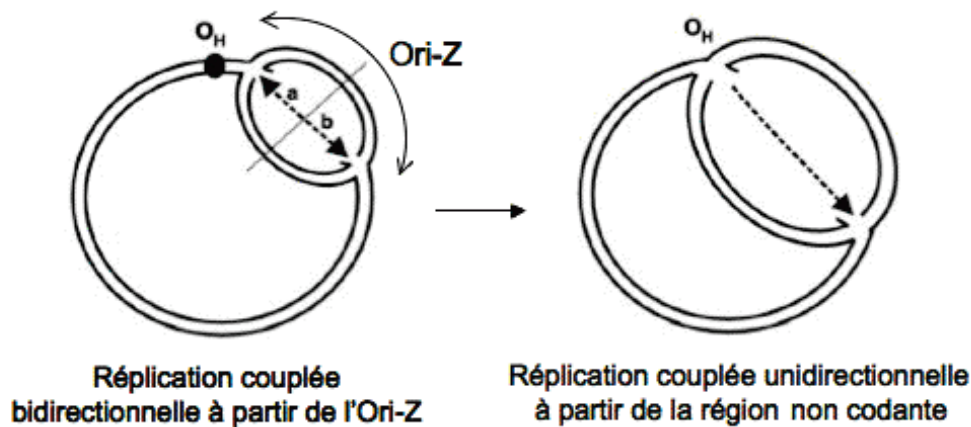


Figure 7 : Réplication couplée des deux brins d'ADNmt.

Le modèle RITOLS (*Ribonucleotide Incorporation Throughout the Lagging-Strand*) est un autre modèle de réplication couplée (Yang, Bowmaker et al. 2002). L'origine de la réplication est localisée dans la boucle D et se fait de façon unidirectionnelle (Yang, Bowmaker et al. 2002; Yasukawa, Yang et al. 2005; Yasukawa, Reyes et al. 2006). La réplication s'effectue de manière continue sur le brin H et discontinue sur le brin L (Figure 8). La réplication du brin L se fait de manière décalée, car il y a synthèse de multiples fragments d'ARN plus ou moins étendus, qui doivent par la suite être convertis en ADN.

Ce modèle s'accorde avec la présence d'intermédiaires de réplication simple brin, les intermédiaires ribonucléiques étant dégradés lors du traitement à la RNase au cours de la purification des mitochondries.

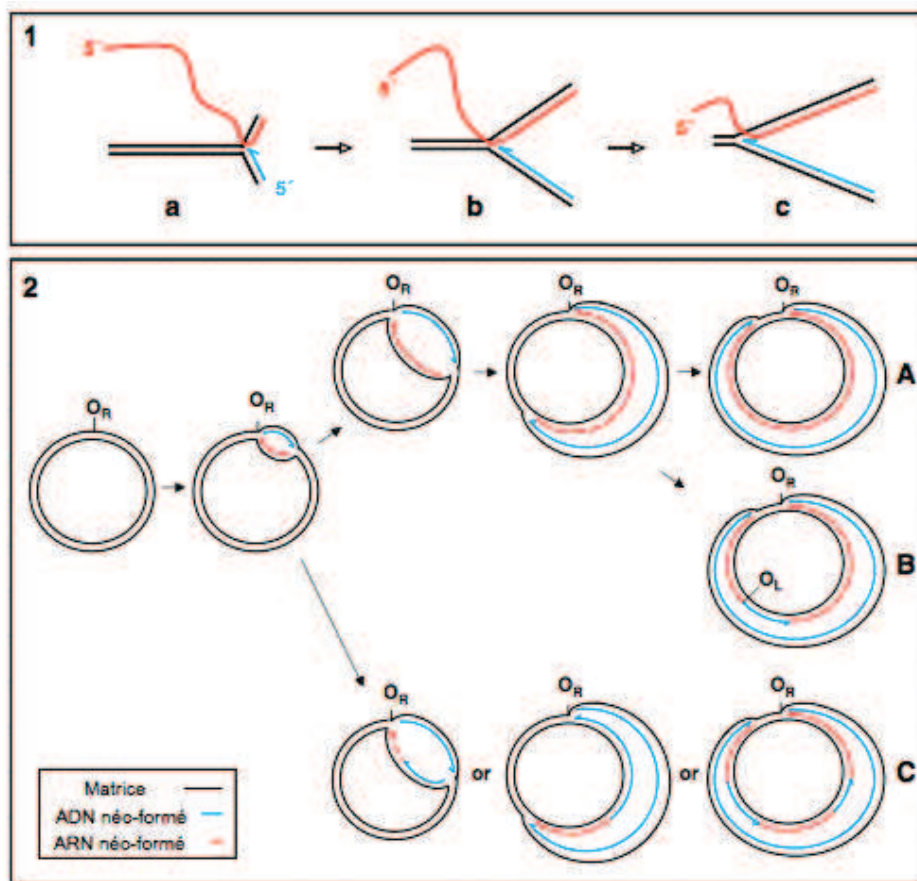


Figure 8 : Modèle des RITOLS de la réplication de l'ADNmt.

En réalité, il semblerait que ces modèles de réplication coexistent. Il y aurait une différence au niveau du mode de réplication de l'ADNmt selon les conditions physiologiques des cellules à partir desquelles les mitochondries ont été purifiées (Bowmaker, Yang et al. 2003). Le modèle de réplication asynchrone et le modèle RITOLS prédominent lorsque les cellules sont en condition normale de culture, alors que le modèle de réplication couplée conventionnelle a lieu lorsque l'amplification de l'ADNmt est nécessaire, à savoir dans des cellules ayant une déplétion de l'ADNmt ou présentant une accélération de la réplication du fait d'une demande physiologique augmentée.

## b. Réparation de l'ADNmt

L'ADNmt est beaucoup moins stable que l'ADNn puisque le taux de mutation de l'ADNmt est 10 à 20 fois plus élevé que celui du génome nucléaire. Plusieurs facteurs peuvent expliquer la formation de mutations de l'ADNmt tels que l'absence d'histones associées à l'ADNmt, des mécanismes de réparation de l'ADNmt moins développés que pour l'ADNn, et la proximité des

espèces réactives de l'oxygène (ROS) produites par la mitochondrie (Bogehagen 1999; Larsen, Rasmussen et al. 2005).

Contrairement à l'ADNn, l'ADNmt n'est pas associé à des histones, donc moins protégé et plus sujet aux mutations. La proximité d'une grande quantité de ROS mutagènes engendrées par le fonctionnement de la mitochondrie peut également fortement endommager l'ADNmt (Beckman and Ames 1999). Enfin, il semblerait que le système de réparation de l'ADNmt soit moins efficace pour certains types d'altérations, comme pour les dimères de bases pyrimidiques (Croteau, Stierum et al. 1999; Borutaite 2010). Le mécanisme de réparation par excision de nucléotide NER (Nucleotide Excision Repair) présent dans le noyau est considéré comme absent dans la mitochondrie (Graziewicz, Longley et al. 2004). Le mécanisme de réparation par excision de bases BER (Base Excision Repair) réalisé par la protéine POLG, semble être le principal mécanisme de réparation de l'ADNmt (Longley, Prasad et al. 1998). Ce mécanisme de réparation est effectué par des ADN glycosylases nucléaires importées à la mitochondrie (uracile ADN glycosylase, 8-oxoguanine ADN glycosylase et 2-OH-A/adénine ADN glycosylase), l'apurinic/aprimidinic (AP)endonucléase, la polymérase POLG ainsi qu'une DNA ligase (Nakabeppu, Tsuchimoto et al. 2004; Gredilla and Stevensner 2012). Ces protéines interviennent pour réparer les dommages de l'ADN causés par les ROS.

D'autres protéines seraient impliquées dans la réparation de l'ADNmt en réponse aux dommages causés par les ROS, comme la protéine mitochondriale MSH5 (MutSHomolog 5), qui se lie à l'ADNmt, interagit avec l'hélicase Twinkle et la polymérase POLG (Bannwarth, Figueroa et al. 2012), ou encore l'hélicase RecQL4 (Chi, Nie et al. 2012).

### **3. Transcription mitochondriale**

La machinerie transcriptionnelle fait intervenir l'ARN polymérase mitochondriale POLRMT, les facteurs de transcription mitochondriaux TFAM (transcription factor A mitochondrial) (Walberg and Clayton 1983) et TFB2M (Seidel-Rogol, McCulloch et al. 2003), ainsi que trois facteurs de terminaison de la transcription mitochondriaux MTERF1 à MTERF3 (Chen, Zhou et al. 2005; Park, Asin-Cayuela et al. 2007; Wenz, Luca et al. 2009). Il existe un homologue de TFB2M, TFB1M, méthyltransférase requise pour méthyler l'ARNr 12S qui n'aurait pas de rôle dans la transcription (Metodieff, Lesko et al. 2009; Litonin, Sologub et al. 2010).



Une fois fixé sur des séquences spécifiques en amont du promoteur, le facteur de transcription TFAM exerce une courbure en induisant des super-tours négatifs sur l'ADNmt, ce qui rend les promoteurs de l'ADNmt accessibles. L'hétérodimère formé par POLRMT et TFB2M va venir s'y fixer et alors initier la transcription (Figure 9). L'initiation de la transcription de l'ADNmt se fait à partir de deux promoteurs, HSP1 (*Heavy-Strand Promoter*) sur le brin H et LSP (*Light-Strand Promoter*) sur le brin L. Il existe un deuxième promoteur, HSP2 sur le brin H qui n'est cependant pas reconnu par la POLRMT et ne pourrait pas initier la transcription (Litonin, Sologub et al. 2010). La transcription qui s'effectue à partir du promoteur LSP produit un transcrite polycistronique codant pour 6 sous-unités du complexe I et 8 ARNt. Celle faite à partir du promoteur HSP1 code pour 12 polypeptides, 2 ARNr 12S et 16S et les ARNt restants.

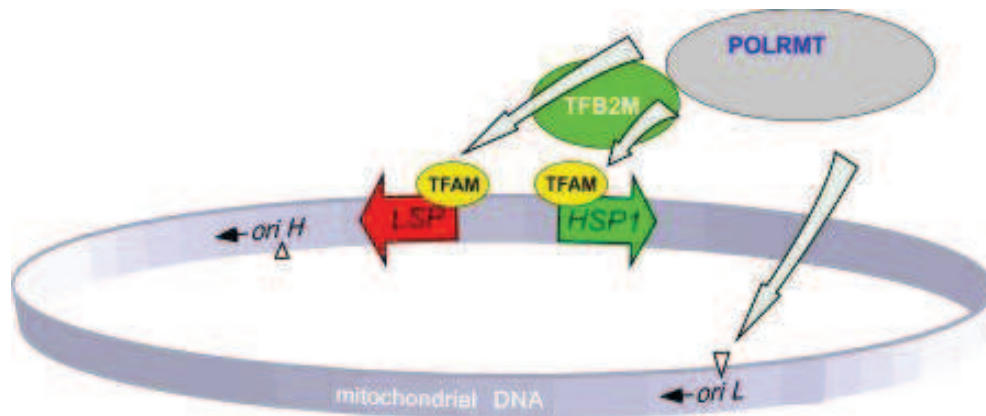


Figure 9 : Schéma de la transcription mitochondriale (Litonin, Sologub et al. 2010).

La transcription par la POLRMT génère un transcrite polycistronique précurseur comportant les ARNm, ARNt et ARNr. Le transcrite primaire doit subir un processus de maturation, non seulement pour donner des ARNt fonctionnels pour la traduction, mais aussi pour former les autres espèces d'ARN, ARNm et ARNr. Les ARNt, localisés entre les ARNm et les ARNr, sont clivés par des RNases (RNases P pour la maturation en 5' et RNase Z pour la maturation en 3'), ce qui va donner individuellement les ARNm, les ARNt et les ARNr matures (Rossmannith 2012). Après le clivage en 5' et 3', les ARNt ne sont pas encore matures. Tout comme les ARNt nucléaires, un triplet CCA est ajouté à leur extrémité 3' grâce à une ATP(CTP):ARNt nucléotidyl transférase (Vortler and Morl 2010) avant de se replier, puis ils subissent toute une série de modifications post-transcriptionnelles indispensables à leur maturation réalisées par des enzymes de modification des ARNt. Certaines sont communes aux ARNt mitochondriaux et cytosoliques,



d'autres sont spécifiques aux ARNt mitochondriaux (Juhling, Morl et al. 2009). L'acide aminé est ensuite attaché au triplet CCA par une aminoacyl-ARNt synthétase spécifique.

Les ARNr et les ARNm subissent aussi des modifications post-transcriptionnelles puisqu'ils sont polyadénylés par la poly(A) polymérase mitochondriale mtPAP (Tomecki, Dmochowska et al. 2004). La polyadénylation permet de compléter le codon stop UAA de la plupart des ARNm, régule la stabilité de l'ARNm et pourrait être également impliquée dans la régulation de la traduction (Montoya, Ojala et al. 1981). La protéine LRPPRC (*Leucine-Rich Pentatricopeptide Repeat Containing*) sert également à la polyadénylation des ARNm mitochondriaux, a donc un effet sur leur stabilité, et régule par conséquent la traduction mitochondriale (Ruzzenente, Metodiev et al. 2012).

### **4. Traduction mitochondriale**

Les 13 protéines codées par le génome mitochondrial sont synthétisées par les ribosomes mitochondriaux dans la matrice mitochondriale. Les ARNr et ARNt mitochondriaux nécessaires à la traduction mitochondriale sont codés par le génome mitochondrial, alors que toutes les autres protéines intervenant dans la machinerie de traduction mitochondriale sont codées par le génome nucléaire. Il s'agit des facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison de la traduction, des protéines ribosomales mitochondriales, des protéines d'assemblage du ribosome, des aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales, des enzymes de modification des ARNt ainsi que des enzymes de méthylation des ARNr. On estime que plus de 150 protéines différentes sont impliquées dans la traduction des 13 protéines codées par l'ADNmt, ce qui montre le fort investissement de la cellule à maintenir cette machinerie génétique propre à la mitochondrie.

Malgré des années de recherche, aucun modèle d'étude fonctionnelle *in vitro* de la machinerie de traduction mitochondriale n'a été établi pour les mammifères. Ce processus n'est pas connu de manière détaillée, et il reste donc beaucoup à découvrir sur la traduction mitochondriale. Même s'il existe de nombreuses similitudes entre le processus de traduction mitochondriale et celui des procaryotes, la traduction mitochondriale présente de nombreuses particularités.

### a. Caractéristiques de la traduction mitochondriale

Seulement 22 ARNt, codés par l'ADNmt, sont suffisants pour la traduction mitochondriale de tous les codons, alors que la machinerie de traduction eucaryote utilise 31 ARNt. Le même ARNt méthionine sert pour l'initiation et l'élongation, en fonction de la présence ou non d'un groupement formyl : l'initiation n'est engagée que lorsque ce groupement est présent.

Les ARNm mitochondriaux ont très peu de nucléotides en 5' UTR et il n'y a pas de capping des ARNm. D'autre part, la queue polyA suit directement ou fait partie du codon stop. La liaison de cette queue polyA à la petite sous-unité ribosomale ne requiert pas l'intervention de facteurs d'initiation ou d'ARNt.

Les ribosomes mitochondriaux ou mitoribosomes sont constitués d'ARNr et de protéines ribosomales mitochondriales MRP. Les mitoribosomes sont constitués de 2 sous-unités, une petite sous-unité de 28S et une grande sous-unité de 39S. L'ensemble constitue un mitoribosome de 55S. Une étude récente montre que les mitoribosomes pourraient également comporter un ARNr 5S (Smirnov, Entelis et al. 2011). Les ribosomes mitochondriaux chez l'Homme comportent deux ARNr, 12S dans la petite sous-unité, et 16S dans la grande sous-unité, mais 81 protéines MRP, les MRPS dans la petite sous-unité, et les MRPL dans la grande sous-unité. Les ribosomes mitochondriaux contiennent donc seulement 25 à 30% d'ARN. Ce taux est faible si on le compare aux autres ribosomes. En effet ceux de bactéries contiennent 60 à 70% d'ARN et les ribosomes cytosoliques eucaryotes en contiennent 50 à 60%. (O'Brien 2002). La diminution de la proportion d'ARNr est compensée par une augmentation du nombre de protéines ribosomales.

Certaines protéines sont impliquées dans l'assemblage du mitoribosome. Il s'agit des facteurs ribosomaux C7orf30, Tfb1M, SPG7, NSUN4 et C4orf14. C7orf30 s'associe à la grande sous-unité ribosomale 39S et est impliquée dans la fonction de la sous-unité 39S (Wanschers, Szklarczyk et al. 2012). Tfb1M assure la méthylation de l'ARNr 12S, indispensable à l'assemblage des deux sous-unités ribosomales. Le facteur de terminaison de la transcription MTERF4 recrute la 5-méthylcytosine ARN méthyltransférase NSUN4 à la grande sous-unité ribosomale et forme un complexe de régulation essentiel pour la biogenèse du ribosome mitochondrial (Spahr, Habermann et al. 2012). La parapléguine SPG7, une protéase m-AAA, est impliquée dans la maturation de la protéine ribosomale MRPL32, ce qui permet l'association de cette dernière avec la sous-unité 39S du ribosome et finalise l'assemblage du ribosome mitochondrial (Nolden,

Ehse et al. 2005). La protéine C4orf14, qui possède un domaine GTPase, va, lorsqu'elle lie le GTP, s'associer à la petite sous-unité 28S, ce qui facilite son assemblage (He, Cooper et al. 2012).

La traduction mitochondriale utilise 22 ARNt, un ARNt par acide aminé à l'exception de la leucine et de la sérine pour lesquelles la mitochondrie possède 2 ARNt isoaccepteurs. Les ARNt mitochondriaux ont des caractéristiques propres et présentent souvent des variations de leur structure bi et tri-dimensionnelle par rapport aux autres ARNt. Ils sont généralement plus courts que les autres ARNt et ne possèdent pas les nucléotides semi-conservés essentiels pour la formation des structures et des interactions tertiaires, en particulier les interactions à longue distance entre les bras T et D présents dans les ARNt cytoplasmiques (Zagryadskaya, Kotlova et al. 2004). Les ARNt mitochondriaux ont pour particularité de subir des modifications post-transcriptionnelles indispensables à leur structure et leur fonction, ainsi qu'à leur spécificité vis-à-vis des codons et des aminoacyl-ARNt synthétases. A ce jour, 19 aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales ont été identifiées, une par ARNt. Seule la glutaminyl-ARNt synthétase mitochondriale n'a pu être mise en évidence, le Gln-ARNt<sup>Gln</sup> étant produit chez l'homme de façon indirecte grâce à une Glu ARNt<sup>Gln</sup>-amidotransférase (ou hGatCAB) (Nagao, Suzuki et al. 2009).

Les protéines codées par l'ADNmt sont des protéines hydrophobes localisées dans la membrane interne mitochondriale. La traduction de l'ARNm mitochondrial se ferait donc au sein d'un complexe accroché à la membrane interne par des liaisons électrostatiques ainsi que par des interactions protéiques (Liu and Spremulli 2000). Chez l'Homme, un récepteur de la membrane interne mitochondriale, Letm1, pourrait servir de protéine de fixation pour la formation d'un complexe de traduction avec le ribosome.

Plusieurs acteurs sont impliqués dans la synthèse et l'intégration des protéines mitochondriales dans la membrane interne mitochondriale. La protéine Crif1 s'associe avec la grande sous-unité ribosomale et participe, en association avec des molécules chaperonnes comme Tid1, à l'intégration des polypeptides mitochondriaux dans la membrane interne mitochondriale (Kim, Kwon et al. 2012). Oxa1L est une protéine localisée dans la membrane interne mitochondriale également impliquée dans l'insertion des protéines mitochondriales dans la membrane interne. La queue C-terminal de Oxa1L (Oxa1L-CTT) se lie au ribosome mitochondrial et permet la synthèse et l'insertion des peptides nouvellement synthétisés dans la membrane interne mitochondriale (Haque, Elmore et al. 2010).

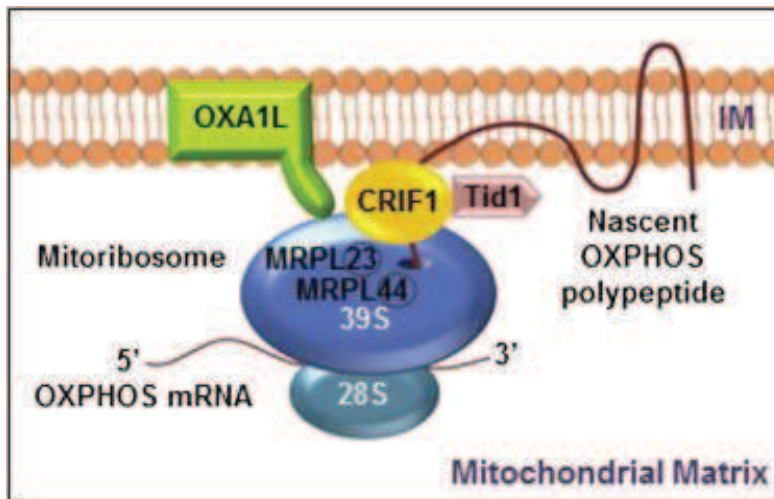


Figure 10 : Schéma des acteurs impliqués dans l'intégration des protéines mitochondriales dans la membrane interne mitochondriale (Kim, Kwon et al. 2012).

## b. Initiation

On compte deux facteurs d'initiation dans les mitochondries de mammifères, IF2mt (*mitochondrial initiation factor 2*) et IF3mt (*mitochondrial initiation factor 3*). Contrairement aux bactéries où on dénombre 3 facteurs d'initiation (IF1, IF2 et IF3), aucun homologue de IF1 n'a jamais été mis en évidence dans la mitochondrie (Sprengli, Coursey et al. 2004). Cependant, IF2mt possède un domaine d'insertion mimant la fonction de l'IF1 bactérien, car tous deux bloquent le site A de liaison de l'aminoacyl-ARNt du ribosome, permettant ainsi la liaison de l'ARNt fMet-ARNt initiateur au site P durant la phase d'initiation (Yassin, Haque et al. 2011).

IF2mt permet la liaison de l'ARNt initiateur fMet-ARNt à la petite sous-unité 28S du ribosome, et aide au bon positionnement de celui-ci sur le codon start de l'ARNm, en présence de GTP. IF3mt induit la liaison de fMet-ARNt au ribosome 55S en présence de IF2mt et d'ARNm. IF3mt peut également se lier au ribosome en absence d'ARNm, ce qui semble signifier que la fixation de l'ARNm au complexe d'initiation de la traduction doit précéder la liaison du fMet-ARNt.

L'initiation de la traduction commence par la reconnaissance de l'ARNm et sa liaison à la petite sous-unité 28S du ribosome (Figure 11). L'ARNm mitochondrial n'a pas de partie 5'UTR, ni de capping par un méthyl-guanilate signalant l'extrémité 5' des ARNm mitochondriaux aux mitoribosomes. Ceci suggère que la reconnaissance de l'ARNm par le ribosome 28S implique un

mécanisme particulier à la mitochondrie, que l'on ne retrouve ni chez les bactéries ni dans le cytosol.

En premier lieu, IF3mt interagit avec le ribosome entier 55S, et va provoquer la dissociation des deux sous-unités ribosomales. La sous-unité 39S est alors libérée, ce qui permet la formation du complexe d'initiation 28S:IF3m. L'ARNm entre dans la sous-unité 28S, qui inspecte le codon se situant à son extrémité 5'. Une fois que le codon start AUG de l'ARNm est bien positionné au niveau du site P, IF2mt en présence de GTP induit la liaison de fMet-ARnt formylmethionyl-ARnt sur le 28S. Le fMet-ARnt lié au codon start, la grande sous-unité 39S vient ensuite se lier au complexe d'initiation, IF2mt hydrolyse le GTP en GDP et les deux facteurs d'initiation sont relargués. On a alors un complexe d'initiation comprenant le ribosome entier 55S, qui est maintenant prêt à entrer en phase d'élongation.

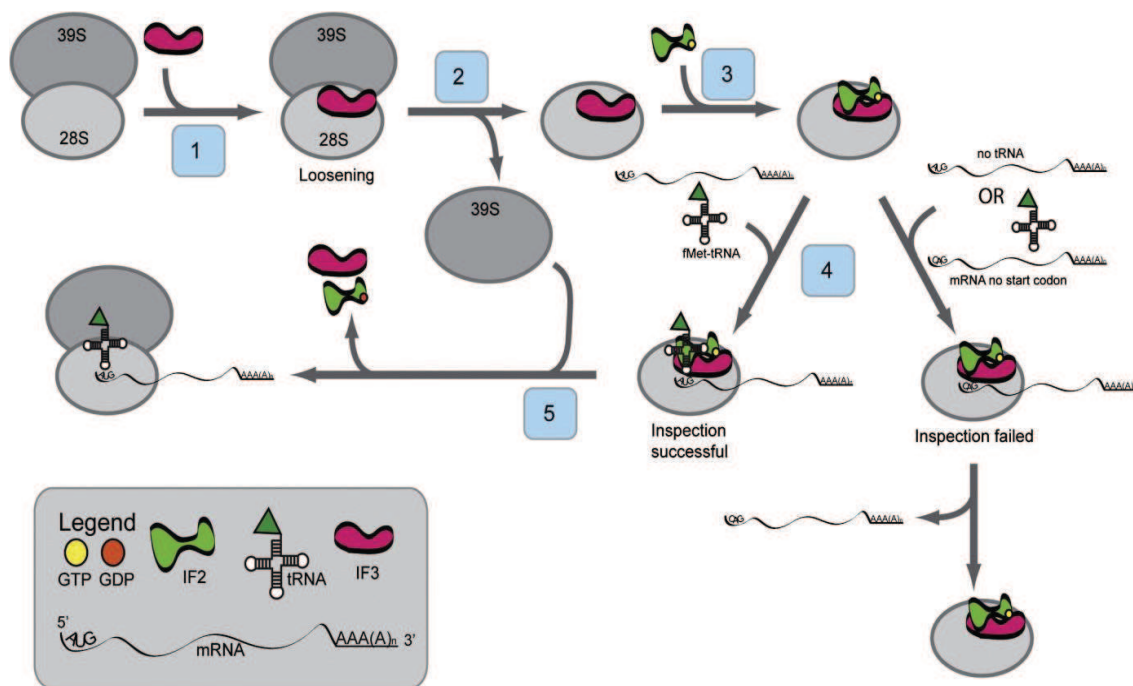


Figure 11 : Schéma de l'initiation de la traduction mitochondriale (Christian and Spremulli 2012).

### c. Elongation

Les étapes d'élongation dans la traduction mitochondriale sont très similaires à celles observées chez les bactéries. Elles impliquent trois facteurs d'élongation mitochondriaux, EFTu, EFG1 et EFTs codés respectivement par les gènes : *TUFM*, *GFM1* et *TSFM*. Contrairement au système procaryote, on n'observe jamais de EFTu et EFTs sous forme libre dans des extraits de mitochondries, mais toujours sous la forme d'un complexe EFTu:EFTs (Worjiax, Bullard et al. 1997). Le principal rôle d'EFTs est de favoriser les échanges de guanosine avec EFTu, ce qui

implique des changements importants dans la structure du facteur EFTu (Zhang, Li et al. 1996). EFG1 est le facteur requis pour l'étape de translocation de la synthèse protéique. Deux formes d'EFG1 sont observées dans la mitochondrie : EFG1 qui a une fonction de translocase durant le processus d'élongation, et EFG2 qui lui a un rôle dans le recyclage du ribosome durant la phase de terminaison.

Lors du processus d'élongation, EFTu, sous sa forme EFTu-GTP, interagit avec un aminoacyl-ARNt (aa-ARNt) formant le complexe ternaire EFTu:GTP:aminoacyl-ARNt et peut effectuer le mécanisme de *proofreading*, à savoir le fait de corriger l'aminoacylation, ainsi qu'assurer la protection contre l'hydrolyse. Il transporte également l'aa-ARNt au site accepteur (site A) du ribosome mitochondrial où le processus de décodage se passe, et où EFTu-GTP est hydrolysé en EFTu-GDP (Figure 12). EFTs est responsable du recyclage d'EFTu en convertissant EFTu-GDP en EFTu-GTP, qui peut alors sous cette forme accrocher un nouveau aminoacyl-ARNt. EFG1 utilise le GTP hydrolysé pour permettre le déplacement de l'aa-ARNt du site A vers le site P du mitoribosome, et la progression de l'ARNm d'un codon. Un nouveau codon se trouve donc exposé dans le site A, il y a fixation d'un nouveau complexe ternaire EFTu:GTP:aminoacyl-ARNt et entrée dans un nouveau cycle d'élongation. Contrairement aux procaryotes, les ribosomes mitochondriaux de mammifères ne possèdent pas de site E (*exit*), site de sortie de l'ARNt du ribosome.

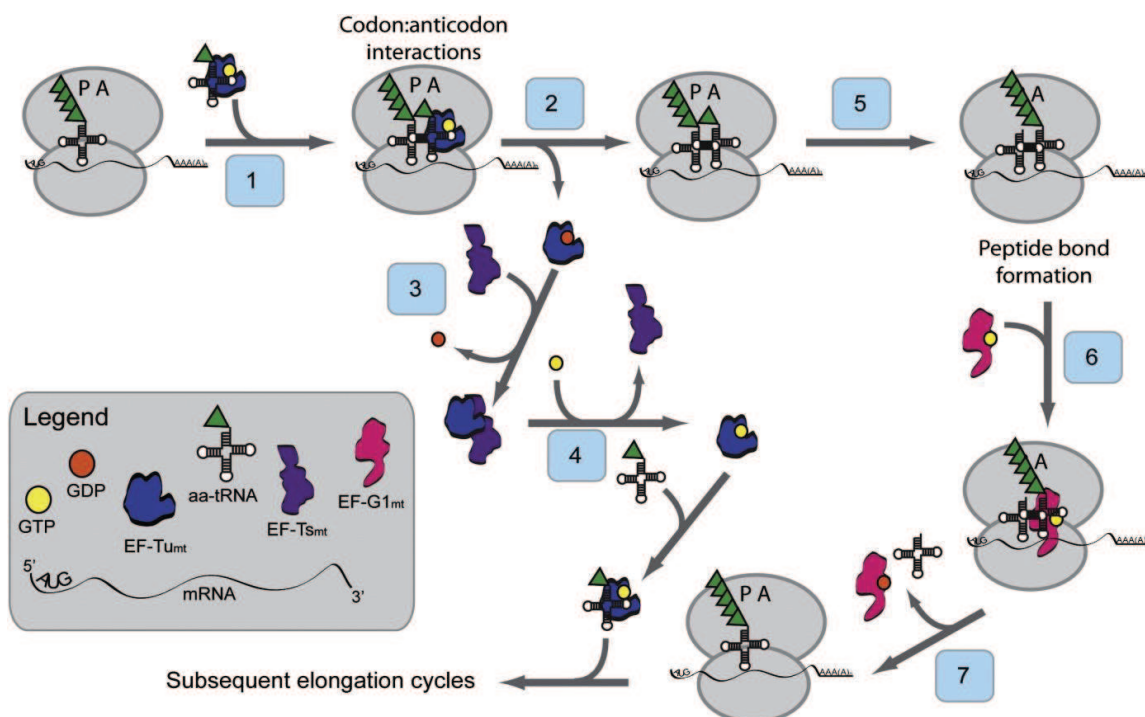


Figure 12 : Schéma de l'élongation de la traduction mitochondriale (Christian and Spremulli 2012).



#### d. Terminaison

Il existe quatre facteurs de terminaison mitochondriaux humains : mtRF1a, mtRF1, Ict1 et C12Orf65. Ces facteurs ont été identifiés initialement par homologie de séquence avec les facteurs de terminaison bactériens RF1, RF2 et RF3. Tous ces facteurs possèdent le motif GGQ dans le site actif, qui favorise la terminaison en permettant l'hydrolyse de la liaison ester peptidyl-ARNt codon spécifique. De par cette propriété d'hydrolyse du peptidyl-ARNt, tous les facteurs de terminaison mitochondriaux appartiennent à la classe I des RF (*release factors*). Le facteur bactérien RF3 appartient à la classe II ; il stimule l'activité de la classe I et sa dissociation du ribosome en présence de GTP, sans spécificité vis-à-vis du codon.

Parmi les quatre facteurs de terminaison mitochondriaux humains, le seul facteur de terminaison nécessaire et suffisant pour terminer pour la traduction des protéines codées par l'ADNmt est mtRF1a. Il possède une fonction peptidyl-ARNt hydrolase uniquement lorsque le codon stop de l'ARNm se situe dans le site A du ribosome (Soleimanpour-Lichaei, Köhl et al. 2007). Sa structure tridimensionnelle lui permet de reconnaître les deux codons stop UAG et UAA, qui sont les deux codons stop utilisés dans les mitochondries des vertébrés. Cependant, deux gènes mitochondriaux, *mtCO1* et *mtND6*, en se terminent pas par les codons stop UAG et UAA mais apparemment par les codons arginine AGA et AGG. Or il a été démontré, grâce à l'utilisation de l'endoribonucléase bactérienne RelE clivant l'ARNm après les codons stop UAG et UAA, que le mitoribosome humain pouvait réaliser un décalage du cadre de lecture de -1 nucléotide en aval des codons AGA et AGG ayant pour conséquence la terminaison des gènes *mtCO1* et *mtND6* uniquement par le codon stop « standard » UAG. Par conséquent, mtRF1a est donc suffisant pour terminer la traduction de toutes les protéines mitochondriales (Temperley, Richter et al. 2010).

mtRF1 provient de la duplication génique de mtRF1a. Contrairement à mtRF1a, mtRF1 se lie au ribosome ayant un ARNm sans codon stop et dont le site A est dépourvu d'ARNm. mtRF1 a une activité peptidyl-ARNt hydrolase et permet donc la libération du peptide naissant seulement en l'absence d'ARNm dans le site A du ribosome mitochondrial (Huynen, Duarte et al. 2012).

ICT1 (Immature colon carcinoma transcript-1) est un composant de la grande sous-unité ribosomale. Tout comme mtRF1a, elle possède une fonction peptidyl-ARNt hydrolase essentielle à la viabilité de la cellule. Son activité hydrolase est ribosome dépendante mais codon indépendante, donc indépendante de la présence d'un codon stop sur l'ARNm. ICT1 a un rôle

essentiel dans l'hydrolyse du peptidyl-ARNt relargué prématurément du ribosome au cours de la phase d'élongation. ICT1 libère alors le peptide naissant ainsi que le ribosome, et est ainsi impliqué dans le recyclage du mitoribosome (Richter, Rorbach et al. 2010).

C12Orf65 est une protéine localisée dans la matrice mitochondriale et n'étant pas associée au ribosome. Sa fonction n'est pas connue, mais tout comme ICT1, son activité est codon indépendante. Aucune activité peptidyl-ARNt hydrolase de C12Orf65 n'a été observée. Les protéines C12Orf65 et ICT1 pourraient avoir des fonctions similaires, puisque la sur-expression de *ICT1* restaure en partie l'anomalie d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire observée chez des patients mutés dans *C12Orf65* (Antonicka, Ostergaard et al. 2010).

Le relargage du complexe ribosome:ARNm:ARNt nécessite l'action des facteurs de recyclage mtRRF (*ribosomal recycling factor*) ainsi que EFG2 (renommé mtRRF2) dont nous avons vu qu'il avait un rôle dans le recyclage ribosomal. Au cours de la terminaison de la traduction, mtRRF agit en même temps que la translocase EFG2.

La terminaison de la traduction se déclenche lorsqu'un codon stop (UAA ou UAG) atteint le site A du ribosome (Figure 13). Le codon stop est reconnu par mtRF1a (ou encore par d'autres facteurs de terminaison) qui induit en présence de GTP l'hydrolyse de la liaison peptidyl-ARNt entre l'ARNt au site P du ribosome et le polypeptide entier synthétisé. mtRRF et mtRRF2 assurent la dissociation du ARNm et du ARNt, des deux sous-unités ribosomales. Une fois mtRRF et mtRRF2 libérés du ribosome, un nouveau cycle de synthèse de protéines peut commencer.

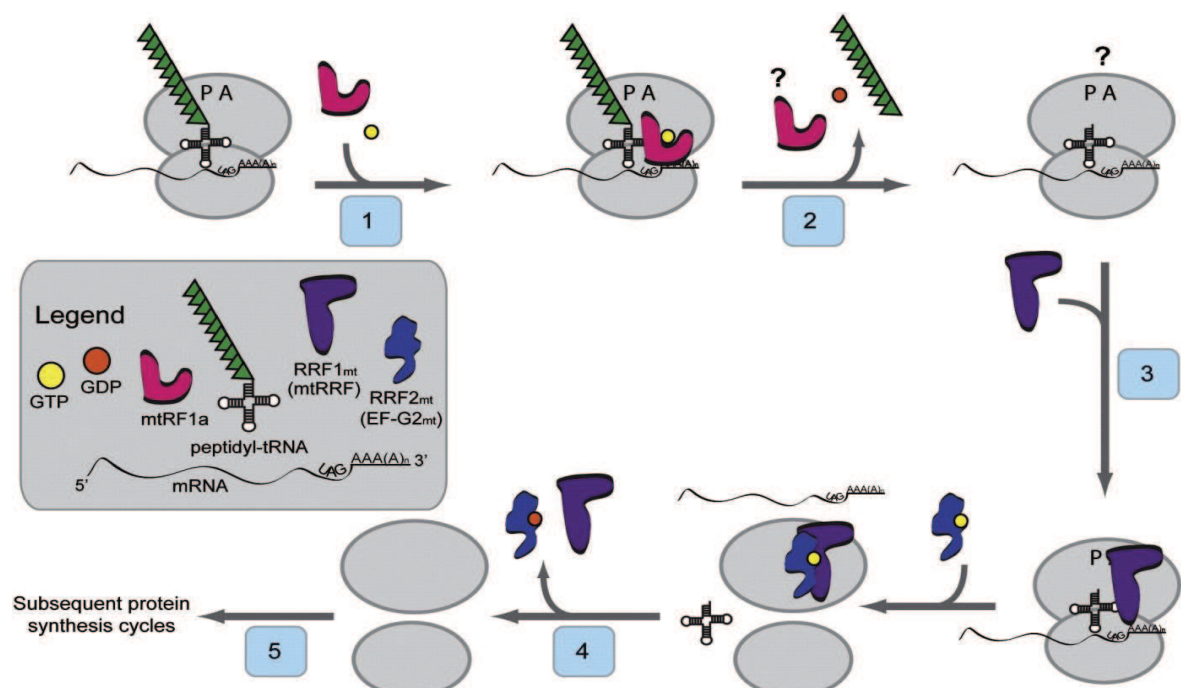


Figure 13 : Schéma de la terminaison de la traduction mitochondriale (Christian and Spremulli 2012).



### **III. LES MALADIES MITOCHONDRIALES**

#### **1. Définition et prévalence**

Les maladies mitochondriales sont définies par une atteinte de la chaîne respiratoire, à l'exclusion de toutes les autres atteintes métaboliques mitochondriales. Elles ont été mises en évidence il y a cinquante ans (Luft, Ikkos et al. 1962). Ce sont les anomalies congénitales du métabolisme les plus fréquentes puisque leur prévalence est estimée à 1 naissance sur 5000 (Debray, Lambert et al. 2008). Du fait de la double origine des protéines mitochondriales, les maladies mitochondriales peuvent être dues à des anomalies présentes dans des gènes mitochondriaux comme nucléaires.

#### **2. Hétérogénéité clinique et génétique**

Le fonctionnement de la quasi-totalité des organes et des tissus chez l'Homme (à l'exception des hématies) dépendant de l'apport énergétique par la chaîne respiratoire ou du moins du métabolisme mitochondrial, un déficit de la chaîne respiratoire peut théoriquement affecter n'importe quel organe ou tissu (Munnich and Rustin 2001). Voilà donc pourquoi on trouve des atteintes cliniques très variées, multisystémiques ou au contraire restreintes à quelques organes ou tissus, comme par exemple le système nerveux central (encéphalopathie), le muscle (myopathie mitochondriale), le foie (insuffisance hépatocellulaire), le cœur (cardiomyopathie hypertrophique), le système hématopoïétique (syndrome de Pearson), les organes sensoriels (cécité, surdité) ou le système endocrinien (diabète).

L'âge de début de la maladie est lui aussi très variable. Certaines maladies mitochondriales se manifestent en période prénatale, dès la naissance ou dans les premières semaines de vie, d'autres ne se déclarent qu'à l'âge adulte. On a donc une extrême hétérogénéité clinique de ces maladies, ce qui rend leur diagnostic relativement complexe.

Du fait de la double origine des protéines mitochondriales, les anomalies génétiques répertoriées dans les maladies mitochondriales peuvent toucher soit des gènes mitochondriaux soit des gènes nucléaires. Ces anomalies génétiques peuvent se transmettre selon tous les modes de transmission génétique, à savoir autosomique récessive, autosomique dominante ou liée à l'X pour les anomalies portées sur les gènes nucléaires, ou une transmission maternelle

pour les mutations affectant les gènes mitochondriaux. Il reste, de plus, de nombreux cas sporadiques pour lesquels l'origine génétique est encore inconnue.

### **3. Diagnostic d'une maladie mitochondriale**

#### **a. Bilan métabolique**

Les examens biochimiques permettant d'aiguiller le diagnostic vers une maladie mitochondriale consistent à doser les concentrations plasmatiques en lactate, le rapport lactate/pyruvate dans le sang, et de doser les corps cétoniques. La détermination de ces valeurs va refléter l'état d'oxydo-réduction dans le cytoplasme et dans la mitochondrie. On observe souvent dans les maladies mitochondriales une hyperlactacidémie persistante (taux de lactates plasmatiques  $>2,5$  mM), un rapport lactate/pyruvate élevé ( $>20$ ) ainsi que les rapports molaires des corps cétoniques élevés ( $>2$ ). Ces anomalies métaboliques reflètent le dysfonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale avec une augmentation de la quantité d'espèces réduites comme le NADH. Le cycle de Krebs peut avoir une activité diminuée, ce qui aboutit à l'accumulation de corps cétoniques durant la période post-prandiale alors que ceux-ci devraient diminuer après le repas sous l'action de l'insuline (Munnich, Rotig et al. 1996; Rotig and Munnich 2003).

Les résultats de ces tests biochimiques ne sont cependant qu'évocateurs et d'autres investigations doivent être mises en place notamment des études enzymologiques de la chaîne respiratoire pour affiner le diagnostic de maladie mitochondriale.

#### **b. Enzymologie de la chaîne respiratoire**

Deux approches enzymologiques permettent l'analyse du métabolisme oxydatif des mitochondries pour le diagnostic d'une maladie mitochondriale (Rustin, Chretien et al. 1994).

La polarographie permet de mesurer la consommation en oxygène dans des fractions enrichies en mitochondries en présence de différents substrats oxydatifs (malate et pyruvate, glutamate, succinate ou palmitate). Cette étude se fait impérativement sur du tissu frais non congelé. La polarographie montre le fonctionnement global de la chaîne respiratoire.

L'étude en spectrophotométrie peut se faire sur du tissu frais ou préalablement congelé. La spectrophotométrie permet d'étudier les différents complexes de la chaîne respiratoire isolément ou non, sur un homogénat tissulaire ou sur une fraction mitochondriale. Cette étude

se fait en bloquant ou en fournissant leurs substrats aux différents complexes. L'étude enzymatique de la chaîne respiratoire permet ainsi de distinguer des déficits isolés de la chaîne respiratoire, n'intéressant qu'un complexe, des déficits multiples touchant au moins 2 complexes.

Dans les maladies mitochondriales, l'atteinte est le plus souvent tissu-spécifique. Cependant, le tissu atteint n'est pas toujours disponible, en particulier dans les atteintes neurologiques. L'étude se fait dans ce cas le plus souvent sur le foie, souvent informatif, ou des fibroblastes du patient qui peuvent ne pas exprimer le déficit. L'enzymologie de la chaîne respiratoire peut donc être normale dans le tissu étudié et un résultat négatif n'élimine donc pas le diagnostic. Dans la mesure du possible et pour un meilleur diagnostic, l'analyse de la chaîne respiratoire doit donc être effectuée sur une biopsie du tissu atteint.

Il faut également souligner que la mise en évidence d'un déficit de la chaîne respiratoire n'est pas nécessairement synonyme de maladie mitochondriale. Ce déficit peut être artéfactuel lorsque le prélèvement a été mal conservé, ou encore être secondaire à une maladie non mitochondriale (Haas, Parikh et al. 2007).

### **c. Diagnostic moléculaire**

Une fois que le diagnostic de maladie mitochondriale est évoqué grâce aux examens biochimiques et enzymologiques, s'ajoutent des investigations moléculaires permettant d'affiner le type d'atteinte mitochondriale.

En ce qui concerne l'analyse du génome mitochondrial, la recherche de délétions se fait par PCR de grande taille (*long range PCR*), qui permet de détecter les réarrangements de l'ADNmt. Les délétions uniques sont généralement sporadiques, tandis que les délétions multiples font penser à une anomalie de la maintenance de l'ADNmt, ce qui conduit à investiguer les gènes nucléaires impliqués.

Les mutations ponctuelles de l'ADNmt peuvent être recherchées par différents moyens. Pour certaines atteintes cliniques bien caractérisées, on peut réaliser un séquençage Sanger ciblé. La recherche d'anomalie de l'ADNmt peut aussi être menée de façon exhaustive grâce à la technique Surveyor : il s'agit d'une nucléase qui clive l'ADN au niveau des mésappariements de l'ADN double brin. Cette technique est utilisée pour analyser l'ADNmt du cas index,

comparativement avec celui de la mère lorsqu'elle est disponible. Il est également possible de réaliser l'étude de l'ADNmt par séquençage haut-débit.

Récemment, les avancées concernant le séquençage haut débit permettent d'utiliser des puces de reséquençage MitoExome afin de séquencer l'ensemble de l'ADNmt ainsi qu'environ 1000 gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales connues pour être impliquées dans des maladies mitochondriales.

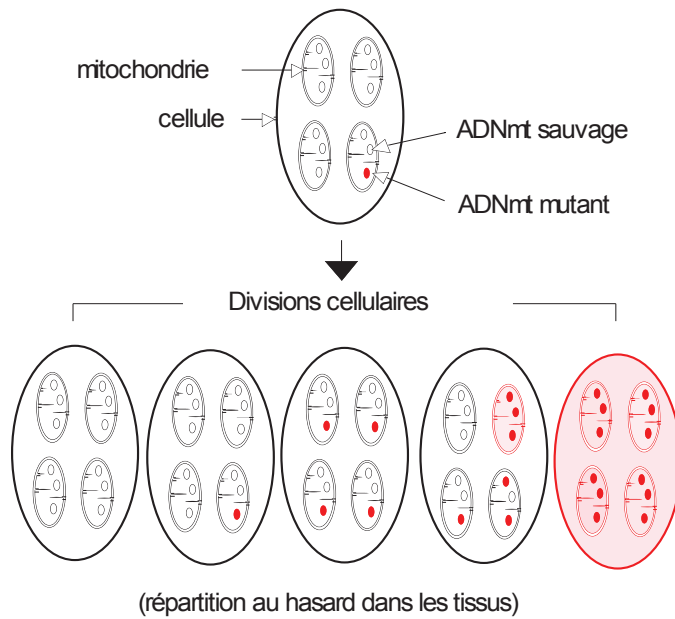
La technique de BN-PAGE s'ajoute maintenant dans le laboratoire hospitalier de diagnostic de génétique à Necker-Enfants Malades aux autres outils diagnostiques. Il s'agit d'une technique de western blot réalisée en conditions non dénaturantes. Cela permet d'étudier l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire et de mettre en évidence des défauts quantitatifs et/ou qualitatifs de ces différents complexes. Dans le cas des déficits isolés de la chaîne respiratoire, la présence d'un phénotype anormal en BN-PAGE peut orienter l'étude vers une anomalie portant sur des protéines d'assemblage du complexe en question et orienter vers un ou plusieurs gènes candidats à séquencer (Calvaruso, Smeitink et al. 2008). Un profil caractéristique en BN-PAGE peut également être une indication d'une anomalie de traduction mitochondriale.

#### **4. Maladies mitochondriales liées à une anomalie du génome mitochondrial**

Les mutations du génome mitochondrial représentent 10 à 15% des maladies mitochondriales (Mancuso, Filosto et al. 2007).

La transmission des maladies liées à une anomalie de l'ADNmt est maternelle, toutes nos mitochondries provenant comme nous l'avons déjà dit uniquement de l'ovocyte fécondé.

Les mutations de l'ADNmt peuvent être hétéroplasmiques ou homoplasmiques. Chaque cellule possède de nombreuses mitochondries renfermant chacune plusieurs copies d'ADNmt. L'hétéroplasmie est la coexistence de copies d'ADNmt sauvages et de copies mutées au sein d'une même mitochondrie et/ou dans différentes mitochondries d'une même cellule tandis que l'homoplasmie d'une mutation renvoie à une situation où toutes les copies de l'ADNmt sont identiques (Figure 14). En ce qui concerne l'hétéroplasmie, un seuil de proportion de molécules d'ADNmt mutées doit être dépassé pour que la fonction du tissu concerné soit affectée et que le phénotype de maladie mitochondriale s'exprime (Chinnery and Turnbull 1997).



**Figure 14 : Ségrégation mitotique et hétéroplasmie.**

*Les cellules germinales primordiales possèdent une mutation de l'ADNmt à l'état hétéroplasmique. Durant le début de l'oogenèse, il y a une réduction drastique de la quantité d'ADNmt correspondant au goulot d'étranglement. Ce processus est aléatoire et cause une répartition inégale des molécules mutées dans les ovocytes matures pouvant aller d'une quantité élevée de mutation jusqu'à une absence totale de la mutation.*

Les molécules d'ADNmt mutées et sauvages se répartiraient de façon aléatoire dans les ovocytes par le phénomène de *bottleneck* ou goulot d'étranglement génétique. Cependant ces mécanismes de distribution lors de la ségrégation mitotique restent mal connus. Ainsi, les taux d'hétéroplasmie peuvent être extrêmement variables d'un ovocyte à l'autre mais aussi d'un tissu à l'autre au sein d'un même organisme (Lightowlers, Chinnery et al. 1997).

### **a. Anomalies qualitatives de l'ADNmt**

Les anomalies qualitatives de l'ADNmt regroupent les grands remaniements (délétions et duplications) ainsi que les mutations ponctuelles, pouvant survenir à la fois dans les gènes mitochondriaux de la synthèse protéique comme les ARNt et ARNr, mais aussi dans les 13 gènes codant pour les protéines de structure de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Bien que la transmission des maladies mitochondriales liées à l'ADNmt soit le plus souvent maternelle, ces maladies peuvent aussi être sporadiques, en particulier dans le cas de grandes délétions.

Les délétions surviennent, pour leur très grande majorité, dans la zone exposée en simple brin pendant la réplication. Il s'agit de délétions uniques, chaque patient présentant dans un ou plusieurs tissus la même délétion à l'état hétéroplasmique. Les mécanismes responsables de ces délétions impliqueraient des recombinaisons homologues entre des séquences répétées, des clivages par des topoisomérases, et des phénomènes de glissement lors de la réplication. Ces délétions sont bornées par des répétitions localisées dans une région particulière, bornée par le gène *COX1* et la fin du gène *cytb* (Figure 15). La taille (de 1 à 8 kb), la position et le nombre de gènes emportés par délétion varient d'un patient à l'autre. Environ 120 délétions ont été publiées. Deux d'entre elles ont été appelées « communes » car elles sont présentes chez 60 % des patients porteurs de délétions ; leur taille est de 4987 et 7436 pb.

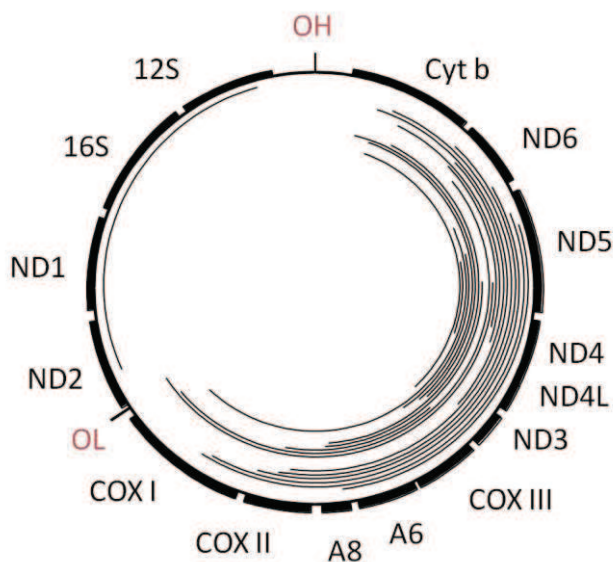


Figure 15 : Délétions de l'ADNmt.

Ces grands remaniements peuvent être responsables d'ophtalmoplégie externe progressive chronique (PEO *Progressive External Ophthalmoplegia*), de l'association diabète et surdité, de syndromes multisystémiques ou encore des syndromes de Kearns-Sayre (KSS) ou de Pearson.

Les mutations ponctuelles de l'ADNmt dans les gènes codant pour les protéines de structure de la chaîne respiratoire sont associées à la maladie de LHON (*Leber Hereditary Optic Neuropathy*), au syndrome NARP (*Neuropathy, Ataxia, Retinitis Pigmentosa*) et au syndrome de Leigh, touchant le plus souvent des gènes du complexe I. Les mutations ponctuelles de gènes codant

pour des ARNt sont responsables du syndrome MELAS (*Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes*), MERRF (*Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers*), de cardiomyopathies et myopathies, de myopathies isolées, de cardiomyopathies hypertrophiques, de tubulopathies, de diabète surdité ou de cPEO. Les mutations ponctuelles de gènes codant pour des ARNr peuvent engendrer une surdité non syndromique induite par les aminosides ou une cardiomyopathie hypertrophique (Ruiz-Pesini, Lott et al. 2007).

### **b. Anomalies quantitatives de l'ADNmt**

Les déplétions de l'ADNmt sont des anomalies quantitatives de l'ADNmt qui consistent en une réduction drastique tissu-spécifique de la quantité normale de molécules d'ADNmt. Tous les gènes impliqués dans la maintenance du génome mitochondrial sont nucléaires. Les déplétions de l'ADNmt sont transmises selon un mode autosomique récessif. Elles constituent donc des anomalies du génome mitochondrial secondaires à des mutations de l'ADN nucléaire. Nous en parlerons plus en détail dans le chapitre suivant.

## **5. Maladies mitochondriales liées à une anomalie du génome nucléaire**

Lorsqu'on ne retrouve pas d'anomalie quantitative ou qualitative de l'ADNmt, on s'oriente alors vers une mutation d'origine nucléaire. Excepté les 13 protéines constitutives de la chaîne respiratoire mitochondriale codées par le génome mitochondrial, toutes les autres protéines de structure ainsi que toutes les autres protéines nécessaires au fonctionnement de la chaîne respiratoire sont codées par l'ADNn.

Tout gène nucléaire codant pour une protéine mitochondriale dont les mutations pourraient déstabiliser la chaîne respiratoire de façon directe ou indirecte est donc un gène candidat dans les maladies mitochondriales. On trouve des anomalies dans des gènes nucléaires codant des protéines de structure, des facteurs d'assemblage de la chaîne respiratoire, des protéines de maintenance de l'ADNmt, des protéines de la traduction de l'ADNmt et des protéines de synthèse du coenzyme Q.

### **a. Gènes de structure des sous-unités de la chaîne respiratoire**

On connaît actuellement tous les gènes de structure des complexes de la chaîne respiratoire. Des mutations dans des gènes codant des sous-unités de tous les complexes I, II, III, IV et V de la chaîne respiratoire ont été décrites. Le plus souvent, ces mutations sont à l'origine d'un déficit isolé de la chaîne respiratoire affectant l'activité du complexe altéré par la mutation.

La majorité des mutations connues à ce jour touche des gènes de structure du complexe I. Les déficits du complexe I sont les plus fréquents dans les pathologies mitochondriales et parmi eux, 40% sont dus à des mutations de protéines de structure. Des mutations sont décrites parmi 12 des 38 sous-unités codées par le génome nucléaire (NDUFA8, A2, B6, V1, V2, S1, S2, S3, S4, S6, S7, S8). Le plus souvent, ces mutations se traduisent par un syndrome de Leigh ou apparenté, responsable d'une encéphalopathie nécrosante précoce et létale (Smeitink, van den Heuvel et al. 2001; Distelmaier, Koopman et al. 2009).

Des mutations ont été identifiées dans des gènes codant des protéines constitutives du complexes II : *SDHA*, responsable de syndrome de Leigh, (Bourgeron, Rustin et al. 1995), *SDHB*, *SDHC* et *SDHD* (Baysal, Ferrell et al. 2000; Niemann and Muller 2000; Astuti, Latif et al. 2001) ; dans deux gènes codant pour des sous-unités structurales du complexe III, *UQCRB* et *UQCRCQ* III (Haut, Brivet et al. 2003; Barel, Shorer et al. 2008) et dans deux gènes de structure du complexe IV, *COX4I2* (Barel, Shorer et al. 2008) et *COX6B1* (Massa, Fernandez-Vizarra et al. 2008). Seule une mutation de la sous unité  $\epsilon$  du complexe V (ATP5E) a été rapportée (Mayr, Havlickova et al. 2010).

### **b. Gènes d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire**

Les gènes impliqués dans l'assemblage des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire permettent, comme leurs noms l'indiquent, l'assemblage des sous-unités de chaque complexe de la chaîne respiratoire, et également l'incorporation, selon les sous-unités, de cofacteurs, de l'hème, de fer ou de cuivre.

Les mutations dans ces gènes sont le plus fréquemment retrouvées dans l'assemblage du complexe I. Son assemblage très complexe se fait de façon modulaire et fait intervenir un grand nombre de protéines. Il s'agit du plus grand complexe de la chaîne respiratoire puisqu'il est



constitué de 45 sous-unités, 38 codées par l'ADNn et de 7 codées par l'ADNmt. Des mutations ont été retrouvées dans les gènes *NDUFAF1* (Dunning, McKenzie et al. 2007), *NDUFAF2* (Ogilvie, Kennaway et al. 2005), *C6orf66* (Saada, Edvardson et al. 2008), *C8orf38* (Pagliarini, Calvo et al. 2008), *C20orf7* (Sugiana, Pagliarini et al. 2008), *ACAD9* (Haack, Danhauser et al. 2010).

Le seul gène impliqué dans l'assemblage du complexe II dont des mutations sont responsables de maladies mitochondriales chez l'homme est le gène codant pour le facteur d'assemblage *SDHAF1* (Ghezzi, Goffrini et al. 2009).

Des mutations dans deux gènes d'assemblage du complexe III ont été décrites. *BCS1L* est un gène codant pour un facteur d'assemblage de la protéine fer-soufre du complexe III. Des mutations dans *BCS1L* ont été identifiées chez des patients présentant des cliniques différentes : une atteinte rénale et hépatique (de Lonlay, Valnot et al. 2001), un syndrome GRACILE (*growth retardation, aminoaciduria, cholestasis, ironoverload, lactacidosis and earlydeath*) (Visapaa, Fellman et al. 2002) ou un syndrome de Bjornstad (surdité de perception et pili torti) (Hinson, Fantin et al. 2007). *TTC19* code pour une protéine de fonction encore inconnue mais en lien avec l'assemblage du complexe III, localisée dans la membrane interne mitochondriale. Ses mutations conduisent à une encéphalopathie progressive (Ghezzi, Arzuffi et al. 2011).

Les mutations de gènes d'assemblage sont une cause importante de déficit du complexe IV en pathologie humaine. C'est dans le gène *SURF1* que la première mutation a été décrite, chez un patient atteint d'un syndrome de Leigh et d'un déficit isolé du complexe IV (Zhu, Yao et al. 1998). Il s'agit d'un des gènes majeurs de déficit du complexe IV, puisqu'il touche 25 à 75% des patients présentant un syndrome de Leigh associé à ce déficit (Sue, Karadimas et al. 2000). Les autres gènes d'assemblage du complexe IV mutés sont *SCO1* (Valnot, Osmond et al. 2000), *COX10* (Valnot, von Kleist-Retzow et al. 2000), *COX15* (Antonicka, Mattman et al. 2003), *SCO2* (Papadopoulou, Sue et al. 1999), *FASTKD2* (Ghezzi, Saada et al. 2008), ou *C12orf62* (Weraarpachai, Sasarman et al. 2012). Ces mutations peuvent être responsables de cardiomyopathies (*COX15, SCO2*), de syndrome de Leigh (*SURF1, COX15*) ou d'autres types d'atteintes neurologiques (*COX10, SCO1, FASTKD2*).

Les anomalies d'assemblage du complexe V décrites sont dues à des mutations soit de *TMEM70* (Cizkova, Stranecky et al. 2008) ou du gène *ATP12* (De Meirleir, Seneca et al. 2004).

Enfin, des pathologies peuvent être causées par des anomalies de synthèse des centres fer-soufre. Ces protéines sont nécessaires à l'homéostasie du fer et au fonctionnement de la chaîne respiratoire. Elles sont incorporées dans les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire.

L'ataxie de Friedreich est une pathologie est due à une mutation du gène nucléaire *FXN* codant la frataxine, protéine mitochondriale impliquée dans la formation des protéines fer-soufre (Campuzano, Montermini et al. 1996; Rotig, de Lonlay et al. 1997). L'ataxie de Friedreich, maladie autosomique récessive, associe une ataxie, une cardiomyopathie hypertrophique et parfois un diabète.

Des mutations dans le gène *ISCU* codant pour la protéine d'assemblage des centres fer-soufre *ISCU* (*iron-sulfur cluster assembly enzyme*) ont été identifiées chez des patients ayant une myopathie avec intolérance à l'effort sévère et une myoglobulinurie (Mochel, Knight et al. 2008).

Un syndrome récessif associant un déficit des complexes respiratoires I, II, III, une anomalie de synthèse en lipoate et une anomalie des 2-oxoacide déshydrogénases sont associées à des mutations dans les gènes d'assemblage des centres fer-soufre *NFU1* et *BOLA3* (Cameron, Janer et al. 2011).

### c. Gènes de maintenance de l'ADNmt

Les mutations présentes dans les gènes de maintenance de l'ADNmt peuvent entraîner des délétions multiples et/ou une déplétion de l'ADNmt, qui se définit comme une importante diminution tissu-spécifique du nombre de copies d'ADNmt. Ces deux pathologies sont accompagnées d'un déficit multiple de la chaîne respiratoire, car il y a réduction des activités des complexes codés par l'ADNmt, c'est-à-dire les complexes I, III, IV et V. Toutefois, on observe souvent un déficit limité au complexe I et au complexe IV.

Les pathologies mitochondriales causées par des délétions multiples de l'ADNmt présentent majoritairement une transmission mendélienne autosomique dominante et apparaissent chez le sujet adulte. Les délétions multiples de l'ADNmt sont causées par des mutations dans les gènes *POLG* (Van Goethem, Dermaut et al. 2001) et *POLG2* (Longley, Clark et al. 2006) codant respectivement pour les sous-unités *POLG- $\alpha$*  et *POLG- $\beta$*  de la polymérase mitochondriale *POLG*, *ANT1* codant pour l'isoforme musculaire du translocateur des adénylates (Kaukonen, Juselius et al. 2000), *PEO1* codant pour l'hélicase mitochondriale Twinkle (Spelbrink, Li et al. 2001) et *OPA1* codant pour une GTPase de la membrane interne mitochondriale (Amati-Bonneau, Valentino et al. 2008). Les mutations dans ces gènes nucléaires sont associées à une ophtalmoplégie externe

progressive de transmission autosomique dominante (adPEO) se traduisant cliniquement par un ptosis, une faiblesse progressive des muscles extra-oculaires et squelettiques à des degrés variables chez le sujet adulte, ou dans le cas des mutations dans le gène *OPA1* par une forme syndromique d'atrophie optique associant ataxie, PEO, et surdité.

Les déplétions de l'ADNmt surviennent quant à elles souvent en période néonatale ou dans l'enfance. Les mutations dans les gènes de déplétions peuvent aboutir à des pathologies très hétérogènes. Les déplétions de l'ADNmt associées à une forme hépato-cérébrale, qui est définie par une atteinte hépatique précoce (cytolyse, insuffisance hépato-cellulaire, cholestase) et une hypotonie axiale, sont dues à des mutations dans les gènes *DGUOK* codant pour la désoxyguanosine kinase (Mandel, Szargel et al. 2001), *POLG* codant pour l'ADN polymérase gamma mitochondriale (Ferrari, Lamantea et al. 2005) et *MPV17* (Spinazzola, Viscomi et al. 2006) (la fonction de la protéine n'est pas connue). Nous reviendrons plus en détail sur cette pathologie dans le paragraphe **Les atteintes hépatiques mitochondriales**. Des mutations de *POLG* peuvent également causer un syndrome d'Alpers (encéphalopathie précoce caractérisée par un retard psychomoteur, une épilepsie récalcitrante et une atteinte hépatique) (Naviaux and Nguyen 2004; Naviaux and Nguyen 2005) ou encore un syndrome de SANDO (neuropathie ataxique sensorielle, dysarthrie et ophtalmoparésie) (Van Goethem, Luoma et al. 2004).

On trouve également des mutations dans le gène *TK2* codant pour la thymidine kinase 2, qui conduisent, elles, à une déplétion dans le muscle squelettique et une myopathie précoce et très sévère (Saada, Shaag et al. 2001).

Des mutations dans le gène *RRM2B* codant pour la petite sous-unité de la ribonucléotide réductase cytosolique, et dans le gène *TYMP* codant pour la thymidine phosphorylase (TP) engendrent des encéphalopathies (mutations *RRM2B*) (Bourdon, Minai et al. 2007) ou un syndrome de MNGIE (*Mitochondrial Neuro Gastrointestinal Encephalopathy*) (mutations *TYMP*) (Nishino, Spinazzola et al. 1999; Giordano, Sebastiani et al. 2008).

Des mutations dans les gènes codant pour les deux sous-unités de la succinyl-CoA synthase : *SUCLG1* pour la sous-unité  $\alpha$  et *SUCLG2* pour la sous-unité  $\beta$ , sont responsables d'une encéphalopathie avec acidose lactique néonatale et décès précoce (Ostergaard, Christensen et al. 2007; Ostergaard, Hansen et al. 2007; Ostergaard 2008).

En plus d'engendrer des délétions multiples, comme nous l'avons déjà vu, les mutations du gène *PEO1* codant pour l'hélicase Twinkle peuvent également engendrer des déplétions de l'ADNmt causant une atteinte hépatique (Sarzi, Goffart et al. 2007).

Ainsi, les anomalies quantitatives ou qualitatives de l'ADNmt sont le résultat de mutations dans des gènes impliqués dans la voie de récupération mitochondriale des dNTP (*DGUOK* et *TK2* mais aussi *SUCLG1* et *SUCLA2*), dans la voie de synthèse des dNTP cytosoliques (*RRM2B* et *THYMTP*), ainsi que dans la réplication de l'ADNmt (*POLG*, *PEO1*) (Figure 16). Si pendant longtemps des atteintes cliniques bien définies étaient associées à des mutations d'un même gène (défaillance hépatique+déplétion de l'ADNmt et mutations de *DGUOK*; encéphalopathie précoce et mutations *RRM2B*), on voit apparaître progressivement des anomalies quantitatives ou qualitatives de l'ADNmt associées à n'importe lequel de ces gènes (myopathie+délétions multiples et mutations de *DGUOK*, (Ronchi, Garone et al. 2012).

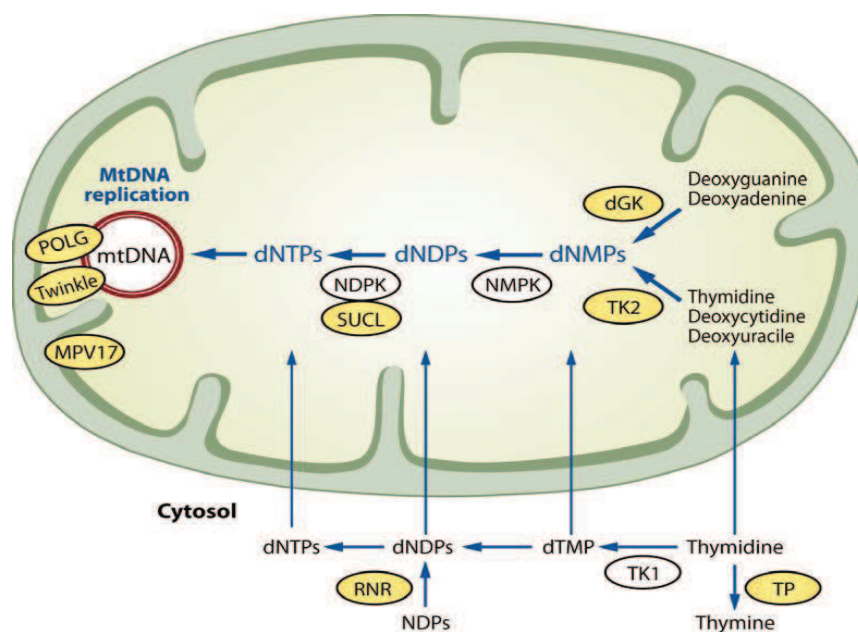


Figure 16 : Gènes impliqués dans les syndromes de déplétion de l'ADNmt (Suomalainen and Isohanni 2010).

#### d. Gènes de synthèse du coenzyme Q

L'ubiquinone (appelée aussi coenzyme  $Q_{10}$  ou  $CoQ_{10}$ ) permet de transférer les électrons des complexes I et II vers le complexe III. La synthèse de l'ubiquinone implique une cascade de réactions catalysées par de nombreuses enzymes. Des mutations dans cinq gènes de cette voie métabolique ont été rapportées : *COQ2* (Quinzii, Naini et al. 2006; Lopez-Martin, Salviati et al.

2007), *PDSS1* (Mollet, Giurgea et al. 2007), *PDSS2* (Lopez 2006) et dans le gène *COQ8/CABC1/ADCK3* (Lagier-Tourenne, Tazir et al. 2008; Mollet, Delahodde et al. 2008), *COQ9* (Duncan, Bitner-Glindzicz et al. 2009) et *COQ4* (Salviati, Trevisson et al. 2012). Ces mutations sont à l'origine de syndromes sévères infantiles associant un déficit de synthèse du coenzyme Q<sub>10</sub> et un déficit des activités des complexes I+III et II+III (Rotig, Mollet et al. 2007).

### e. Gènes impliqués dans la traduction mitochondriale

Les maladies mitochondriales liées à des mutations dans des gènes impliqués dans la traduction mitochondriale sont dues à des mutations de gènes mitochondriaux ou nucléaires. La majorité de ces maladies est liée à des mutations du génome mitochondrial. Plus de 150 mutations touchant les gènes codant pour les ARNt mitochondriaux ont été décrites (Christian and Spemulli 2012), associées à des déficits multiples dans les complexes I, III IV et V de la chaîne respiratoire. Les mutations les plus fréquentes sont situées dans les ARNt<sup>Leu</sup> et l'ARNt<sup>Lys</sup>, qui sont des *hotspot* de mutations de l'ADNmt. Par exemple la mutation A3243G de l'ARNt<sup>Leu</sup> est responsable du syndrome MELAS, et la mutation A8344G de l'ARNt<sup>Lys</sup>, responsable du syndrome MERRF.

En dehors des ARNt et ARNr, toutes les protéines et facteurs protéiques nécessaires à la traduction mitochondriale sont codés par le génome nucléaire. Des mutations ont été rapportées dans des gènes codant pour des aminoacyl-ARNt synthétases et des enzymes de modifications des ARNt et des ARNr, des protéines ribosomales et des facteurs d'assemblage du ribosome, ainsi que des facteurs d'élongation et de terminaison de la traduction. Une grande partie de ces mutations ont été rapportées par divers groupes durant les trois années de ce travail de thèse.

Des mutations touchant 4 gènes de modification des ARNt mitochondriaux ont été décrites : *PUS1* (Bykhovskaya, Casas et al. 2004), *TRMU* (Zeharia, Shaag et al. 2009), *MTFMT* (Tucker, Hershman et al. 2011) et *MTO1* (Ghezzi, Baruffini et al. 2012).

*PUS1* (pseudouridylate synthase 1) est une enzyme localisée dans le noyau et la mitochondrie, qui modifie l'uridine en pseudouridine à plusieurs positions dans les ARNt mitochondriaux et cytosoliques, et augmente l'efficacité de la synthèse protéique des deux compartiments. Ces mutations sont responsables de MLASA (*Myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anemia*).

*TRMU* (ARN 5-méthylaminométhyl-2-thiouridylate méthyltransférase) est une méthyltransférase qui ajoute un résidu thiol au niveau de la base wobble de l'anti codon des ARNt mitochondriaux

Lysine, Glutamine, et Acide Glutamique. Ses mutations provoquent une anomalie de la traduction mitochondriale et engendrent une atteinte hépatique mitochondriale associée à un déficit multiple de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Une partie du pool de Met-ARNt(Met) est formylé par la protéine MTFMT (mitochondrial methionyl-ARNtformyltransferase) pour générer la N-formylmethionine-ARNt(Met) (fMet-ARNt(met)), utilisée pour l'initiation de la traduction. Des mutations décrites dans le gène MTFMT sont responsables de syndrome de Leigh et déficit multiple de la chaîne respiratoire.

MTO1 (mitochondrial translation optimization 1) augmente l'efficacité de la traduction mitochondriale en catalysant la 5-carboxyméthylaminométhylation de la base wooble uridine de trois ARNt mitochondriaux. Des mutations dans *MTO1* sont responsables d'acidose lactique et cardiomyopathie hypertrophique.

Sur les 19 aminoacyl-ARNt synthétases mitochondriales que compte la traduction mitochondriale, des mutations dans 9 gènes codant pour des aminoacyl-ARNt synthétases sont rapportées à ce jour. Il s'agit des gènes *RARS2* (Edvardson, Shaag et al. 2007), *DARS2* (Scheper, van der Klok et al. 2007), *YARS2* (Riley, Cooper et al. 2010), *SARS2* (Belostotsky, Ben-Shalom et al. 2011), *HARS2* (Pierce, Chisholm et al. 2011), *AARS2* (Gotz, Tynismaa et al. 2011), *EARS2* (Steenweg, Ghezzi et al. 2012), *MARS2* (Bayat, Thiffault et al. 2012) et *FARS2* (Elo, Yadavalli et al. 2012). Ces mutations peuvent causer une encéphalopathie (*RARS2*, *DARS2* et *EARS2*), une cardiomyopathie infantile (*AARS2*), un syndrome de Perrault (*HARS2*), un syndrome d'Alpers (*FARS2*), un syndrome de MLASA (*Myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anemia*) (*YARS2*), un syndrome de HUPRA (*Hyperuricemia, Pulmonary hypertension, Renal Failure in infancy and Alkalosis*) (*SARS2*) ou un ARSAL (*Autosomal Recessive Spastic Ataxia with Leukoencephalopathy*) (*MARS2*).

Sur les 80 protéines ribosomales mitochondriales identifiées, des mutations dans seulement quatre gènes codant pour des protéines ribosomales mitochondriales ont été décrites à ce jour. Il s'agit de *MRPS16* (Miller, Saada et al. 2004), *MRPS22* (Saada, Shaag et al. 2007), *MRPL3* (Galniche, Serre et al. 2011) et *MRPL44* (Carroll, Isohanni et al. 2013).

La mutation de *MRPS22* entraîne une cardiomyopathie hypertrophique et un syndrome de Wolff Parkinson White associés à une hypotonie, une dysmorphie, une tubulopathie et des crises convulsives. La mutation de *MRPS16* engendre une acidose lactique néonatale fatale. Les mutations de *MRPL3* et *MRPL44* sont responsables de cardiomyopathies mitochondriales. Toutes ces mutations ont des conséquences sur la stabilité de la protéine elle-même même qui

entraîne un défaut d'assemblage de la sous-unité ribosomale, mais sont également responsables d'une diminution d'expression des ARNr mitochondriaux 12S ou 16S.

Sont décrites également des mutations dans les gènes codant pour les 3 facteurs d'élongation : *TUFM/EFTu* (Valente, Tiranti et al. 2007), *GFM1/EFG1* (Coenen, Antonicka et al. 2004; Antonicka, Sasarman et al. 2006; Valente, Tiranti et al. 2007) et *TSMF/EFTs* (Smeitink, Elpeleg et al. 2006). Des mutations dans ces différents facteurs d'élongation peuvent provoquer des atteintes phénotypiques très variables, à savoir par exemple pour le gène *GFM1* soit une encéphalopathie, soit une atteinte hépatique. Pour *TSMF*, cette hétérogénéité est encore plus forte car la même mutation R312W aboutit à trois phénotypes très différents : encéphalopathie ou cardiomyopathie hypertrophique (Smeitink, Elpeleg et al. 2006) ou atteinte hépatique mitochondriale (Vedrenne, Galmiche et al. 2012).

Des mutations dans la paraplégine SPG7, une sous-unité de la protéase m-AAA, sont responsables d'une anomalie d'assemblage de ribosome, en inhibant le processing de MRPL32, protéine indispensable pour l'assemblage de la grande sous-unité ribosomale (Nolden, Ehses et al. 2005).

Les mutations dans des gènes de la traduction mitochondriale sont responsables de déficits multiples de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cependant, des déficits isolés associés à des anomalies de traduction mitochondriale ont également été décrits. C'est le cas de mutations dans le gène *TACO1*, qui code pour un activateur traductionnel de la cytochrome c oxydase (COX). Les mutations dans *TACO1* entraînent un déficit du complexe IV associé avec un syndrome de Leigh. De même, une substitution A354V décrite dans le gène *LRPPRC* codant pour une protéine essentielle à la maturation de la COX en stabilisant les transcrits des gènes mitochondriaux *COXI*, *COXII* et *COXIII*, est responsable d'un syndrome de Leigh LSCF (French-Canadian type of Leigh syndrome) caractérisé par un déficit isolé du complexe IV.

Des gènes dont la fonction demeure peu connue sont également impliqués dans la traduction. Des mutations dans le gène *C12Orf65* (Antonicka, Ostergaard et al. 2010) sont responsables d'atrophie optique, ophtalmoplégie et syndrome de Leigh. La protéine C12orf65 serait un facteur de terminaison de la traduction mitochondriale, notamment par la présence du motif GGQ caractéristique des facteurs de terminaison de classe I (mtRF1, mtRF1a et ICT1).

Des mutations dans le gène *C12Orf62* causent une acidose lactique néonatale (Weraarpachai, Sasarman et al. 2012). La protéine C12orf62 est une petite protéine membranaire

mitochondriale de fonction inconnue, requise dans la synthèse de COXI, et donc dans les premières étapes de l'assemblage de la COX.

RMND1 (required for meiotic nuclear division 1) est une protéine membranaire de fonction inconnue, localisée à la mitochondrie. Elle serait nécessaire à la traduction mitochondriale en étant impliquée dans l'assemblage ou la maintenance du ribosome. La mutation décrite cause une encéphalopathie et un déficit multiple de la chaîne respiratoire (Janer, Antonicka et al. 2012).

Le Tableau 1 suivant résume les principales caractéristiques cliniques, enzymologiques et biochimiques associées aux mutations identifiées à ce jour dans les gènes nucléaires de la traduction mitochondriale.



Gène muté		Nombre de patients décrits		Présentation clinique		Complexes déficitaires en enzymologie		Anomalies en BN-PAGE		Anomalies de traduction <i>in vitro</i>	
Modification des ARNt											
<i>MTFMT</i>	2 patients/familles	Syndrome de Leigh	Fibroblastes, muscle et foie : I, III et IV	nd	Déficit généralisé						
<i>MTO1</i>	3 patients/2 familles	Acidose lactique et cardiomyopathie hypertrophique	Muscle : I et IV Fibroblastes : I, III et IV	nd	Léger déficit sur Var1 et ATP6						
<i>PUS1</i>	9 patients	Syndrome de MLASA	Fibroblastes : I et IV Muscle : I, III, IV et V	nd	Déficit généralisé						
<i>TRMU</i>	13 patients/familles	Insuffisance hépatique	Foie : I, III et IV Muscle : IV	Fibroblastes : I, III, IV et V	Déficit généralisé						
Aminoacyl-ARNt synthétases											
<i>AARS2</i>	3 patients/2 familles	Cardiomyopathie infantile	nd	Cœur et cerveau : I et IV Foie normal	Pas de déficit						
<i>DARS2</i>	30 familles + 8 patients	Leucoencéphalopathie	Normal dans le muscle et les fibroblastes	Normal	nd						
<i>EARS2</i>	12 patients/familles	Encéphalopathie	Muscle : I, III et IV Fibroblastes : III et IV	nd	nd						
<i>FARS2</i>	2 familles	Syndrome d'Alpers	Muscle : IV	Cerveau : I et IV Muscle : IV	nd						
<i>HARS2</i>	1 famille	Syndrome de Perrault	nd	nd	nd						
<i>MARS2</i>	6 patients/ 3 familles	Syndrome ARSAL	Fibroblastes: I	nd	Déficit généralisé						
<i>RARS2</i>	3 patients	Encéphalopathie, hypoplasie pontocérébelleuse	Normal dans les fibroblastes et les lymphoblastes	nd	nd						
<i>SARS2</i>	3 patients	Syndrome de HUPRA	Muscle : I, III, IV	nd	nd						
<i>YARS2</i>	4 patients/3 familles	Syndrome de MLASA	Muscle : I, III, IV Fibroblastes normaux	nd	Déficit de cytb, COX1, COX2-3, ATP6						
Protéines ribosomales											
<i>MRPL3</i>	1 famille	Cardiomyopathie mitochondriale	Muscle et fibroblastes : I, III, IV et V	Fibroblastes : I, IV et V	Déficit de COX1, COX2 et bandes supplémentaires						
<i>MRPL44</i>	1 famille	Cardiomyopathie hypertrophique	Cœur et muscle : I et IV	Fibroblastes : I et IV	Pas de déficit						

Gène muté		Nombre de patients décrits		Présentation clinique		Complexes déficitaires en enzymologie		Anomalies en BN-PAGE		Anomalies de traduction <i>in vitro</i>	
<i>MRPS16</i>	1 patient	Acidose lactique néonatale fatale	Muscle : I, III, IV et V Foie : I, III et IV Fibroblastes : IV	nd	Déficit généralisé						
<i>MRPS22</i>	4 patients 2 familles	Cardiomyopathie hypertrophique et syndrome de Wolff Parkinson White, hypotonie, dysmorphie, tubulopathie et crises convulsives	Muscle : I, III, IV et V Fibroblastes : I, III et IV	Fibroblastes : I et IV surtout, III	Déficit généralisé principalement ND5, ND6, COX2-3						
<b>Activateurs de la traduction</b>											
<i>LRPPRC</i>	55 patients	Syndrome de Leigh LSCF	Fibroblastes : IV	nd	Déficit de COX1 (léger de COX3)						
<i>TACO1</i>	1 patient	Syndrome de Leigh	Fibroblastes: IV	Fibroblastes: IV	Déficit de COX1						
<b>Facteurs d'élongation</b>											
<i>GFM1</i>	5 patients/familles	Encéphalopathie Insuffisance hépatique	Fibroblastes : I, III et IV Muscle : I, III, III et IV	Fibroblastes : I, III et IV	Déficit généralisé prédominant sur COX1, COX2-3, ND5, ND6 et bandes supplémentaires de haut PM						
<i>TSM</i>	3 patients/familles	Encéphalopathie Cardiomyopathie hypertrophique Insuffisance hépatique	Fibroblastes : I, III et IV Muscle : I, III et IV	Fibroblastes : I, IV et V	Déficit généralisé prédominant sur ND5, CO1, ND4, ND1, COX2-3, ND6, ND4L						
<i>TUFM</i>	1 patient	Encéphalopathie	Fibroblastes et muscle : I, III, IV et V	nd	Déficit généralisé prédominant sur CO1, ND2, ND1, ATP6						
<b>Facteur de terminaison</b>											
<i>C12orf65</i>	3 patients	Atrophie optique, ophtalmoplégie et syndrome de Leigh	Fibroblastes : IV	Fibroblastes : I, IV et V	Déficit généralisé uniforme (-30%)						
<b>Facteurs de fonction inconnue</b>											
<i>C12orf62</i>	1 famille	Acidose lactique néonatale	Fibroblastes : IV	Fibroblastes: IV	Déficit de COX1 (50%)						
<i>RMND1</i>	2 familles	Encéphalopathie	Fibroblastes : IV	Fibroblastes : I, III, IV et V	Déficit généralisé uniforme (-20%)						

**Tableau 1 : Caractéristiques cliniques, enzymologiques et observées en Western-Blot, en association avec les mutations identifiées dans les gènes nucléaires de la traduction mitochondriale.**

(MLSA : Myopathy, lactic acidosis and sideroblastic anemia; HUPRA : Hyperuricemia, Pulmonary hypertension, Renal Failure in infancy and Alkalosis; ARSAL : Autosomal Recessive Spastic Ataxia with Leukoencephalopathy; LSCF : French-Canadian type of Leigh syndrome).

## **7. Hétérogénéité des déficits multiples de la chaîne respiratoire**

Les maladies mitochondriales sont associées soit à des déficits d'un seul complexe, soit à des déficits multiples touchant plusieurs complexes de la chaîne respiratoire. Dans notre série de patients à l'Hôpital Necker-Enfants Malades, les déficits les plus fréquents sont les déficits multiples (51,6%), les déficits isolés en complexe I (22,4%) et en complexe IV (13,3%). Les déficits d'un complexe isolé peuvent être dus à des mutations d'un gène nucléaire ou mitochondrial codant pour l'une des sous-unités de ce complexe, mais peuvent également être causés par des mutations d'un gène codant pour une protéine d'assemblage du complexe déficitaire.

Les déficits multiples de la chaîne respiratoire sont des déficits combinés de plusieurs complexes de la chaîne respiratoire, pouvant résulter de mécanismes très différents que nous avons détaillés précédemment, tels que des délétions de l'ADNmt, des anomalies de traduction, d'import des protéines mitochondriales ou de maturation de cofacteurs, mais aussi d'une anomalie du métabolisme de l'ADNmt (réplication, transcription, maintien). Ces déficits sont associés à des présentations cliniques extrêmement variées comme une encéphalopathie, une myopathie, une cardiomyopathie, une atteinte hépatique, une atteinte sensorielle (surdité, cécité), un diabète etc.

Il est toutefois possible, au sein de cette hétérogénéité clinique des déficits multiples de la chaîne respiratoire, d'identifier des groupes de patients cliniquement homogènes. C'est le cas en particulier des atteintes hépatiques mitochondriales, qui font l'objet de ce travail de thèse.

## **8. Les atteintes hépatiques mitochondriales**

Le foie est fortement dépendant en ATP, qui lui est nécessaire pour réaliser ses activités biosynthétiques et de détoxification. Les hépatocytes contiennent pour cela une forte densité en mitochondries. Un déficit de la chaîne respiratoire dans les hépatocytes va perturber directement le métabolisme de la cellule, pouvant engendrer des stéatoses (accumulation de triglycérides dans les hépatocytes), des cholestases (diminution ou arrêt de la sécrétion de la bile dans les voies biliaires pouvant provoquer un ictère), une atteinte progressive du foie ou une cirrhose du foie correspondant à la destruction des hépatocytes.

### a. Etiologie des atteintes hépatiques mitochondriales

Les atteintes hépatiques mitochondriales sont généralement classées en atteintes primaires ou secondaires de la chaîne respiratoire. Les atteintes primaires sont liées à des anomalies touchant directement la chaîne respiratoire mitochondriale, alors que les atteintes secondaires sont dues à une atteinte de la chaîne respiratoire pouvant résulter d'une anomalie de l'oxydation des acides gras ou de déficit du cycle de l'urée. Nous nous intéressons ici seulement aux atteintes hépatiques mitochondriales primaires.

Les hépatopathies mitochondriales primaires regroupent plusieurs types d'atteintes présentées dans le Tableau 2 suivant :

Atteinte	Age des premiers signes	Premiers signes	Signes extra-hépatiques
<b>Atteinte hépatique néonatale</b>	Néonatal	Insuffisance hépatocellulaire sévère, acidose lactique, hypoglycémie, acidose lactique	Hypotonie, vomissements, difficultés d'alimentation, apnée
<b>Atteinte hépatique à début retardé</b>	Quelques semaines à quelques mois	Hépatomégalie, cytolyse, insuffisance hépatocellulaire, cholestase, hyperlactacidémie	Atteinte neurologique, stagnation pondérale, comas hypoglycémiques
<b>Syndrome d'Alpers</b>	Enfants et jeunes adultes	Hépatomégalie, ictère, cytolyse, cholestase, cirrhose et atteinte hépatique progressive	Symptômes neurologiques, régression psychomotrice, épilepsie, myoclonies, EEG caractéristique
<b>Syndrome de Pearson</b>	Avant 2 mois	Hépatomégalie, cholestase, atteinte hépatique progressive	Anémie sidéroblastique, pancytopénie, insuffisance pancréatique externe, tubulopathie
<b>Atrophie villositaire</b>	Jeunes enfants	Hépatomégalie, cytolyse et insuffisance hépatique modérées, stéatose microvésiculaire	Anorexie, vomissement, diarrhées chroniques, atrophie villositaire, diabète mellitus, ataxie cérébelleuse, surdité sensorineurale, retinis pigmentosa,
<b>Neurohépatopathie de type Navajo</b>	Enfants	Ictère, ascites, épisodes Reye-syndrome like, cirrhose et atteinte hépatique progressive	Neuropathie sensorimotrice, anesthésie cornéenne, mutilation acrale, lésions progressives de la substance blanche du CNS

Tableau 2 : Caractéristiques des différents types d'atteintes hépatiques mitochondriales.

Les gènes et processus impliqués dans ces différentes atteintes hépatiques mitochondriales sont le gène *DGUOK* pour l'atteinte hépatique néonatale, *POLG* pour le syndrome d'Alpers et l'atteinte hépatique néonatale, *MPV17* pour l'atteinte hépatique néonatale et la neurohépatopathie de type Navajo, des remaniements de l'ADNmt (délétions-duplications) pour le syndrome de Pearson et des réarrangements de l'ADNmt pour le syndrome d'atrophie villositaire.

Les syndromes d'Alpers, de Pearson, d'atrophie villositaire, et la neurohépatopathie de type Navajo sont très bien caractérisés génétiquement. Les atteintes hépatiques mitochondriales sévères néonatales et à début retardé, qui font l'objet de ce travail et que nous nommerons par désormais soucis de clarté atteintes hépatiques mitochondriales, ont des causes génétiques beaucoup plus hétérogènes.

### **b. Les atteintes hépatiques mitochondriales**

Il existe deux formes d'atteinte hépatique mitochondriale : une forme syndromique (pouvant associer à l'atteinte hépatique une atteinte multiviscérale, une tubulopathie, une cardiomyopathie, des convulsions ou une malformation) et une forme isolée, appelée forme hépatocérébrale, associant une atteinte hépatique dans les premiers mois de vie (cytolyse, insuffisance hépatique ou cholestase) et une hypotonie axiale.

Les formes syndromiques peuvent être causées par des mutations dans les gènes nucléaires *BCS1L* et *SCO1*, codant pour des facteurs d'assemblage de la chaîne respiratoire. Les mutations de *BCS1L* sont responsables d'un déficit isolé du complexe III et associées notamment à une atteinte rénale et hépatique (de Lonlay, Valnot et al. 2001) et du syndrome GRACILE (Visapaa, Fellman et al. 2002). Les mutations de *SCO1* causent une atteinte hépatique néonatale et une encéphalopathie associées à un déficit isolé du complexe IV (Valnot, Osmond et al. 2000).

Dans notre service de génétique à Necker-Enfants Malades, parmi notre cohorte de 139 patients ayant une atteinte hépatique mitochondriale, 86 ont une forme isolée et 53 une forme syndromique (Figure 17).

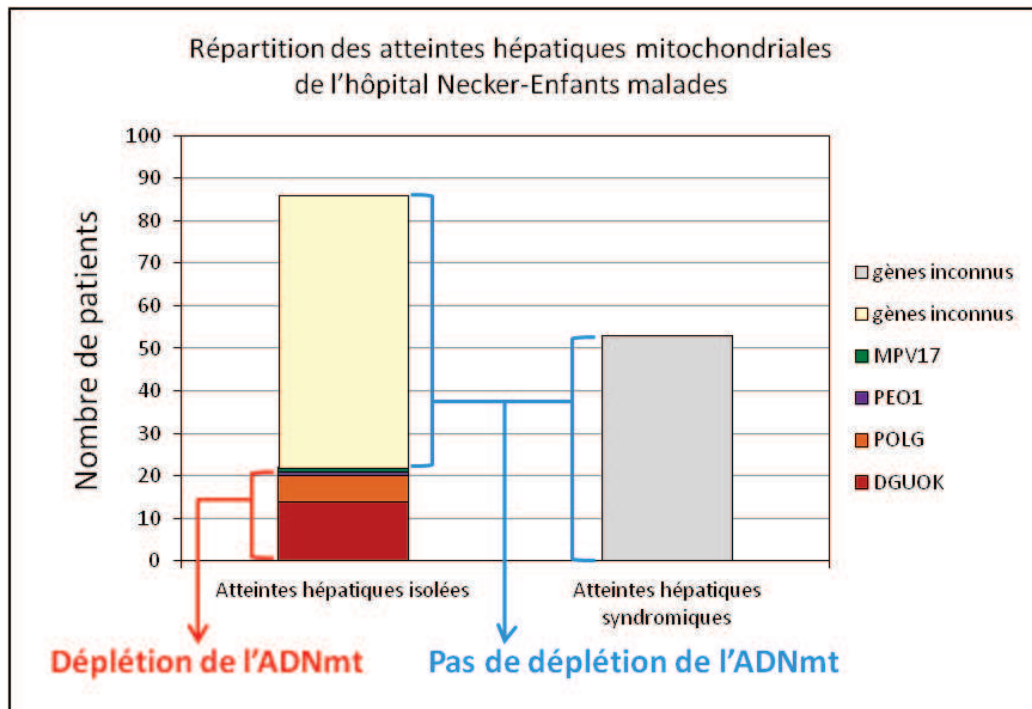


Figure 17 : Répartition des atteintes hépatiques mitochondriales isolées et syndromiques parmi notre cohorte de patients de l'hôpital Necker-Enfants Malades.

*i. Les atteintes hépatiques mitochondriales avec déplétion de l'ADNmt*

26% de nos patients ayant une atteinte hépatique mitochondriale isolée présentent une déplétion sévère (<10%) de l'ADNmt mise en évidence dans le foie. Les déplétions de l'ADNmt résultent d'une anomalie du maintien de l'ADNmt.

On connaît actuellement quatre gènes nucléaires dont les mutations conduisent à des déplétions de l'ADNmt dans le foie et à une atteinte hépatique précoce : *DGUOK* (déoxyguanosine kinase mitochondriale) (Mandel, Szargel et al. 2001), *POLG* (ADN polymérase gamma mitochondriale) (Ferrari, Lamantea et al. 2005), *MPV17* (protéine de fonction inconnue) (Spinazzola, Viscomi et al. 2006) et *PEO1* (hélicase/primase mitochondriale Twinkle) (Sarzi, Goffart et al. 2007). Ces gènes sont impliqués dans la maintenance ou la réplication de l'ADNmt. Parmi eux, les gènes majeurs sont *DGUOK* et *POLG*. Dans notre service de génétique à Necker-Enfants Malades, 22 patients ont une déplétion dans le foie, soit 26% des atteintes hépatiques isolées. Tous sont caractérisés génétiquement : 14 sont mutés dans le gène *DGUOK*, 6 dans le gène *POLG*, 1 pour le gène *PEO1* et 1 pour le gène *MPV17*.

### *ii. Les atteintes hépatiques mitochondriales sans déplétion de l'ADNmt*

Les autres patients de notre cohorte ayant une atteinte hépatique mitochondriale isolée (74%), ainsi que les 53 patients ayant une atteinte hépatique syndromique, ne présentent pas de déplétion de l'ADNmt et ne sont pas bien caractérisés génétiquement.

Au début de ce travail, seules des mutations dans le gène *GFM1* (Coenen, Antonicka et al. 2004; Antonicka, Sasarman et al. 2006) étaient connues. Ces mutations sont associées à un déficit multiple de la chaîne respiratoire mitochondriale et une anomalie de la traduction des protéines codées par l'ADNmt. L'atteinte hépatique est caractérisée par une cholestase, rapidement suivie d'une insuffisance hépatocellulaire sévère. Chacune de ces études rapporte des mutations identifiées chez des frères et sœurs appartenant à une seule famille, ce qui constitue une difficulté majeure pour le diagnostic génétique, et laisse supposer une forte hétérogénéité génétique des atteintes hépatiques sans déplétion de l'ADNmt.

## IV. OBJECTIFS DU PROJET DE RECHERCHE

Ce travail de recherche trouve son origine devant la réelle absence de diagnostic moléculaire proposé aux patients atteints de déficits multiples de la chaîne respiratoire associés à des pathologies sévères de l'enfant. Parmi ces pathologies mal diagnostiquées, nous nous concentrons plus particulièrement sur les atteintes hépatiques mitochondriales.

Alors que les atteintes hépatiques avec déplétion sont très bien caractérisées génétiquement et reflètent une hétérogénéité génétique assez restreinte avec 4 gènes responsables de la maladie et deux gènes majeurs *DGUOK* et *POLG*, les atteintes hépatiques sans déplétion de l'ADNmt n'ont commencé à l'être que plus récemment et montrent une très grande hétérogénéité génétique, chaque mutation dans un nouveau gène identifié ne concernant que quelques familles tout au plus.

Afin d'identifier de nouveaux gènes d'atteinte hépatique d'origine mitochondriale, nous avons dû constituer tout d'abord une cohorte de patients homogène cliniquement présentant une atteinte hépatique mitochondriale associée ou non avec une atteinte neurologique, et ne présentant pas de déplétion majeure de l'ADNmt dans le foie. Nous avons pu former, en combinant des patients des hôpitaux Necker-Enfants Malades et du Kremlin-Bicêtre, une cohorte de 70 patients dont nous disposons de matériel (fibroblastes, ADN) nécessaire à leur étude. Pour la plupart d'entre eux, des anomalies qualitatives et quantitatives de l'ADN mitochondrial ont été exclues, ainsi que des mutations dans les gènes *DGUOK* et *POLG* responsables d'hépatopathie avec déplétion. Nous émettons donc l'hypothèse que les mutations à l'origine de ces maladies touchent les gènes impliqués soit dans la traduction des protéines codées par l'ADN mitochondrial (comme tous les gènes identifiés jusqu'à présent pour ce groupe de patients), soit dans la transcription mitochondriale.

Face à l'hétérogénéité génétique de notre cohorte, nous avons dû utiliser différentes stratégies afin de permettre au mieux l'identification moléculaire de ces patients.

Pour les individus issus de familles consanguines et/ou multiplex pour lesquels l'ADN de plusieurs membres de la famille était disponible, nous avons opté pour la stratégie de cartographie génétique permettant de mettre en évidence des régions candidates d'homozygotie ou d'haploidentité. Pour les autres patients sporadiques, il est impossible de séquencer tous les gènes impliqués dans la traduction mitochondriale, d'autant plus qu'ils ne



sont probablement pas tous connus. Nous avons donc choisi une méthode globale à savoir l'étude du transcriptome, dans le but en un premier temps de mettre en évidence un ou plusieurs transcrits très sous-exprimés qui pourraient résulter de l'existence de mutations non-sens. Une autre utilisation du transcriptome fut de définir des groupes homogènes de patients et ainsi de cibler des familles de gènes ou des voies de signalisation à regarder prioritairement.

Puis au cours de ma thèse s'est développée l'approche de séquençage haut débit exome, qui permet le séquençage de l'ensemble des régions codantes du génome, à savoir les exons et leurs séquences flanquantes, qui ne représentent que 3% du génome humain. Cette approche est particulièrement pertinente dans le cas de maladies génétiques mendéliennes car la plupart des variations pathogènes sont localisées dans les séquences codantes du génome (Botstein and Risch 2003). Un séquençage haut débit exome a donc ensuite été réalisé sur l'ADN génomique de 38 patients de notre cohorte d'atteinte hépatique mitochondriale.

L'identification de nouveaux gènes d'atteinte hépatique mitochondriale sans déplétion de l'ADNmt est importante pour plusieurs raisons. Tout d'abord établir un diagnostic moléculaire est essentiel pour la famille du patient, souvent décédé, puisqu'il permet, de par l'extrême sévérité de ces pathologies, de proposer un diagnostic prénatal si les parents le souhaitent. De plus, l'identification de nouveaux gènes responsables d'hépatopathies sans déplétion, malgré l'extrême hétérogénéité génétique et donc l'utilité restreinte pour le diagnostic, peut néanmoins permettre de découvrir de nouvelles protéines impliquées dans la traduction ou la transcription mitochondriale, de nouveaux mécanismes physiologiques et physiopathologiques.

# *MATERIEL ET METHODES*

---



## I. CULTURES CELLULAIRES

Les fibroblastes de patients en culture nous ont servi aux extractions d'ADN, d'ARN et de protéines.

Les fibroblastes sont cultivés dans des flasques de 75 cm<sup>2</sup> de surface (T75) avec 12 mL de milieu de culture DMEM enrichi au Glutamax® (Invitrogen) complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 200 U/mL de pénicilline, 200 U/mL de streptomycine. De l'uridine (50 µg/mL) et du pyruvate de sodium (2,5 mM) sont ajoutés au milieu de culture afin de maintenir les cellules exprimant un déficit de la chaîne respiratoire (Bourgeron, Chretien et al. 1993). Les cellules sont incubées en atmosphère contrôlée à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>.

## II. EXTRACTION D'ADN GENOMIQUE

L'extraction d'ADN génomique a été réalisée à partir de fibroblastes en culture et de prélèvements sanguins.

### 1. Isolement des leucocytes à partir de prélèvements sanguins

Les prélèvements de sang périphérique sur anticoagulant (EDTA ou héparine) (10 mL) sont centrifugés 10 minutes à 2500 g puis le plasma (surnageant) est éliminé. Les globules rouges sont lysés par un ajout de 50 mL de solution de lyse des globules rouges (NH<sub>4</sub>Cl 130 mM, NH<sub>4</sub>CO<sub>3</sub> 0,9 mM) pendant 10-15 minutes. Le culot de leucocytes est récupéré après centrifugation (5 minutes, 2500 g), le surnageant est éliminé. Un lavage peut être réalisé en renouvelant cette étape avec 25-50 mL de solution de lyse des globules rouges. Le culot de leucocytes peut être conservé à -20°C.

### 2. Extraction d'ADN génomique à partir de leucocytes

L'extraction d'ADN se fait à partir d'un culot de leucocytes extrait à partir de 10mL de sang. Les cellules sont incubées dans 5 mL de tampon de protéinase K (NaCl 10 mM, EDTA 10 mM, Tris HCl pH8 10 mM, SDS 0,5%, protéinase K 0,1 mg/mL) pendant 2 heures à 56°C ou toute la nuit à 37°C. Les débris protéiques sont ensuite éliminés par traitement au phénol saturé (phénol/Tris HCl pH 8,4 0,2M/chloroforme-alcool isoamylique (24:1) 3/1/1 vol/vol/vol) sous agitation pendant 10

minutes, puis centrifugés 1 minute à 2500 g. La phase inférieure, qui contient le phénol et les débris protéiques, est éliminée sous sorbonne avec une pompe à vide. Pour une meilleure purification, cette étape est renouvelée sur la phase supérieure aqueuse qui contient l'ADN. La phase aqueuse est ensuite traitée avec un volume de solution de chloroforme-alcool iso-amylque 24:1, agitée 10 minutes au turbulatur et centrifugée 1 minute à 2500 g. La phase inférieure est éliminée sous sorbonne avec une pompe à vide. L'ADN est alors précipité par addition de deux volumes d'éthanol absolu froid et de NaCl 0,4 mM final puis maintenu pendant 1 heure à -80°C. L'ADN est récupéré après une centrifugation de 10 minutes à 13000 g. Il est lavé deux fois dans 30 mL d'éthanol 70%, séché à l'air puis dissout dans un volume adéquat d'eau.

### **3. Extraction d'ADN génomique à partir de fibroblastes**

L'extraction est réalisée à partir de culots de fibroblastes en culture, obtenus à partir d'une flasque T75, à l'aide du kit NUCLEON GENOMIC DNA Extraction Kits (GE Health Care RPN 8512). Les cellules sont d'abord lysées. Le lysat cellulaire est ensuite déprotéinisé par du perchlorate de sodium (500 µL), qui élimine les protéines. Par la suite l'ADN est extrait par ajout de chloroforme (2 mL) et de résine NUCLEON (300 µL), puis récupéré après centrifugation dans la phase aqueuse, les protéines se retrouvant dans la phase organique. L'ADN est ensuite précipité par addition d'éthanol absolu froid (2 volumes), lavé par de l'éthanol 70% (2 mL), séché, puis resuspendu dans un volume adéquat d'eau bi-distillée.

Les échantillons d'ADN sont dosés par mesure de l'absorbance à 260 nm sur un spectrophotomètre NanoDrop® ND-1000. Les mesures de l'absorbance de l'échantillon à 260 nm, 280 nm et à 230 nm permettent d'établir les rapports 260/280 et 260/230 représentant respectivement les rapports ADN/protéines et ADN/contaminants organiques, ce qui permet d'évaluer la pureté de l'échantillon. Les solutions d'ADN utilisées pour la suite des expériences ont une concentration finale de 25 ng/µL.

## **III. EXTRACTION D'ARN ET SYNTHÈSE D'ADN<sub>c</sub>**

Les ARN totaux sont extraits à partir de cultures primaires de fibroblastes avec le kit Rneasy Midi (QIAGEN) selon les recommandations du fabricant. Les ARN ainsi obtenus ont été utilisés pour la synthèse d'ADN complémentaire (ADN<sub>c</sub>) ainsi que pour l'étude du transcriptome.

Les échantillons d'ARN sont traités à la DNase en présence de RNase inhibitor. Par la suite, la réaction de reverse transcription (RT-PCR) est réalisée avec le mélange réactionnel suivant : 4  $\mu$ L d'ARN traité (45 ng d'ARN), 5  $\mu$ L de tampon (5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl), 2.5  $\mu$ M de random hexamer ou d'oligo dT, 1 mM de chaque dNTP et 50 U de transcriptase inverse MuLV (kit Gene amp, RNA PCR, Core Kit, Applied Bio Systems, Roche) dans un volume final de 20  $\mu$ L. Les mélanges réactionnels sont incubés successivement 10 minutes à température ambiante, puis 15 minutes à 42°C, 5 minutes à 99°C, puis 5 minutes à 5°C.

#### IV. RT-PCR QUANTITATIVE

L'expression relative des ARNr 12S et 16S a été mesurée en triplicats par RT-PCR quantitative. La quantité de transcrits dans les fibroblastes des patients et des contrôles a été déterminée à l'aide de Power SYBR® Green (Applied Biosystems) et normalisée par rapport au gène de ménage  $\beta$ -actine. La PCR est réalisée dans un volume final de 20  $\mu$ L contenant 2  $\mu$ L d'ADNc, 0,5  $\mu$ M de chaque amorce et 10  $\mu$ L de SYBR® Green 1X. L'amplification est réalisée avec le thermocycleur 7300 Real Time PCR System (Applied Biosystems) dans les conditions suivantes : dénaturation primaire à 95°C pendant 10 min puis pendant 40 cycles, une dénaturation à 95°C pendant 15 sec et une hybridation/élongation à 60°C pendant 1 min suivie par une courbe de dissociation. Les résultats sont normalisés par rapport à l'ADNc actine. Les amorces nécessaires à la réalisation de l'amplification des ADNc sont reportées dans le Tableau 3 suivant :

Amorces	Séquence
$\beta$ actine-F	CAATGAAGATCAAGATCATTGC
$\beta$ actine-R	CTAAGTCATAGTCCGCCTAGAAG
ARNr 12S-F	TAGAGGAGCCTGTTCTGTAATCGA
ARNr 12S-R	TGCGCTTACTTTGTAGCCTTCAT
ARNr 16S-F	GGCGATAGAAATTGAAACTGGC
ARNr 16S-R	AGGTAGCTCGTCTGGTTTCGGGG

Tableau 3 : Amorces utilisées pour l'amplification par PCRq des ADNc actine, ARNr 12S et ARNr16S.

## V. PCR (POLYMERASE CHAIN REACTION)

Les séquences codantes et les jonctions intron-exon des gènes sont amplifiées sur ADN génomique au moyen d'oligonucléotides introniques. Les ADNc eux sont amplifiés après reverse transcription au moyen d'oligonucléotides exoniques.

Les amorces sont constituées d'une vingtaine de bases complémentaires des bornes de la séquence à amplifier et ont toutes deux la même température d'hybridation.

Les exons ou les fragments d'ADNc sont amplifiés séparément dans des microtubes de 200 µL. Nous réalisons une PCR dans un volume final de 25 µL contenant 2 ng d'ADN, 0,2 mM de dNTPs, du Tampon 1X, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,8 µM de chaque amorce et 0,10 µL de Taq Invitrogen™ (0,02 UI). L'amplification réalisée est une PCR par essais dite « touch down PCR » permettant la réduction d'amplifications non spécifiques. La température d'hybridation est très haute pendant les premiers cycles afin d'être dans des conditions de forte stringence. La température d'hybridation est progressivement abaissée jusqu'à atteindre la température d'hybridation adéquate aux couples oligonucléotides utilisés. La PCR est faite dans un thermocycler Applied Biosystems 2720 dans les conditions suivantes : Dénaturation (5 min à 94°C), 30 cycles d'amplification : 30 secondes (sec) à 94°C (dénaturation) ; 30 sec d'hybridation à la température d'hybridation des amorces ; 30 sec à 72°C (élongation), 7 min d'élongation à 72°C.

Les produits de PCR sont testés sur gel d'agarose 2% en présence de bromure d'éthidium (1 µg/mL).

## VI. SEQUENÇAGE

Le séquençage est fait selon la technique de Sanger. La synthèse du brin à séquencer est effectuée en présence d'une amorce spécifique, de désoxynucléotides (dNTP) et des quatre didésoxynucléotides (ddNTP) marqués chacun avec un fluorophore différent. Les quatre ddNTPs n'ont pas d'hydroxyle en 3', ce qui arrête la synthèse du brin. Leur incorporation se fait de manière aléatoire et la synthèse est ainsi stoppée à chaque base, ce qui génère des fragments de toutes tailles.

Le produit de PCR est purifié avec l'ExoSAP-IT® (Amersham, usb®). La purification s'effectue en ajoutant un mélange de 3 µL d'H<sub>2</sub>O distillée et 1 µL d'ExoSAP-IT® à 4 µL de PCR. Le mélange est

incubé dans un thermocycler 2720 (PE Biosystem) : 15 min à 37°C puis 15 min à 80°C pour dénaturer l'enzyme.

Une fois purifiés, aux 4 µL de produit PCR purifié sont ajoutés 1 µL de Terminator Ready Reaction Mix (kit ABI PrismBigDye Terminator.PE Biosystem), et 10 ng d'oligonucléotides sens ou anti-sens (les mêmes que ceux de la PCR) dans un volume final de 10 µL. La réaction de séquence s'effectue dans un thermocycler Applied Biosystems 2720 : Dénaturation (3 min à 96°C) suivie de 30 cycles d'amplification : 20 sec à 96°C (dénaturation) ; 20 sec à la température d'hybridation de la PCR ; 1 min à 60°C (élongation). Les fragments ainsi obtenus sont ensuite purifiés sur des petites colonnes de sephadex G50 (Sigma-Aldrich®) afin d'éliminer les sels, les dNTPs et ddNTPs libres. Les échantillons sont déposés dans un séquenceur automatique de type ABI PRISM™ 3130xIs, PE Biosystem. Les données recueillies sont analysées grâce au logiciel SEQUENCING ANALYSIS 3.1 (PE-ABI®) et Seqscape (PE-ABI®).

## VII. CARTOGRAPHIE GENETIQUE

Certaines familles consanguines et/ou multiplex de la cohorte d'atteinte hépatique ont fait l'objet d'une étude de cartographie génétique à l'aide de marqueurs SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*).

Les études de liaison génétique sont fondées sur la corrélation entre la transmission de la maladie et celle de certains marqueurs polymorphes. Lorsqu'un marqueur est proche du gène responsable de la maladie, il sera préférentiellement transmis avec la pathologie. La liaison génétique entre les loci est évaluée par un calcul statistique de *lod-score* : ce score estime la probabilité que la transmission du ou des marqueurs soit liée au hasard ou au contraire à une véritable liaison génétique. Le *lod-score* minimal requis pour affirmer une liaison est de 3 pour une pathologie autosomique récessive. Plus le nombre d'individus atteints est important dans les différentes familles étudiées, plus la valeur du *lod-score* est significative.

La carte ainsi établie permet de déterminer l'hérédité des allèles de chaque enfant dans l'hypothèse d'une maladie autosomique récessive, et de localiser les régions d'homozygotie (famille consanguine) ou d'haploidentité (famille non consanguine) spécifiques des enfants atteints, susceptibles de contenir le gène muté.



Le nombre de ces régions est inversement proportionnel au nombre de sujets étudiés et donc à la taille de la famille. Pour une famille consanguine, le degré de consanguinité est aussi important : une consanguinité lointaine implique que le nombre de recombinaisons méiotiques a été plus important et donc que la taille de la ou des régions d'homozygotie sont plus réduites.

Pour les familles étudiées, plusieurs génotypages ont été réalisés grâce à deux puces différentes. Une puce Affymetrix GeneChip Human Mapping 10K Array Xba 142 2.0, permettant l'analyse d'environ 1100 SNP, et une puce Human Mapping 250K Nspl array permettant l'analyse 263000 SNP répartis sur l'ensemble du génome.

Les analyses de liaison génétique ont été ensuite effectuées en collaboration avec la Plateforme Bioinformatique Paris-Descartes. Le calcul du *lod-score* a été réalisé grâce au logiciel statistique Merlin. Ce calcul prend en compte le degré de consanguinité et la fréquence allélique des différents marqueurs référencés dans les banques de données de The Human Genome Database (GDB) et du Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH).

## VIII. SEQUENCAGE HAUT DEBIT EXOME

Le séquençage haut débit exome a été réalisé dans le laboratoire de Génétique humaine des maladies infectieuses de JL Casanova au Rockefeller University à New-York. 2 µg d'ADN génomique de nos 30 patients atteinte hépatique mitochondriale ont été isolés à partir de cultures de fibroblastes. La capture exome est réalisée grâce au kit Sure Select Human All Exon kit (Agilent Technologies). Le séquençage single-end est réalisé sur un Illumina Genome Analyser IIx (Illumina) qui génère des « reads » de 72 pb. Les séquences sont alignées avec la séquence référence du génome humain (hg18) en utilisant le Burrow-Wheeler Aligner. Les résultats obtenus sont transférés à la Plateforme Bioinformatique de l'Université Paris Descartes (P Nitschké) pour analyse des résultats. Le traitement informatique est réalisé par le Genome Analysis Toolkit (GATK), SAMtools, et Picard tools. Les variants sont annotés au moyen du logiciel Polyweb développé par cette plateforme.

## IX. CGH (COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION) ARRAY

La technique de puce d'hybridation génomique comparative ou CGH array permet de détecter les variations du nombre de copies d'ADN (duplication, délétion). L'hybridation sur des puces, présentant des portions connues du génome, permet de cartographier des réarrangements génomiques avec une résolution de plus en plus élevée. Ces puces renferment des oligonucléotides simples brin synthétisés *in situ* par photolithographie.

Nous avons réalisé deux puces CGH à oligonucléotides dans l'hypothèse que le deuxième événement de mutation dans le gène *NOX5* pour les enfants atteints des familles IA, TO et BI est un réarrangement génomique.

La première CGH a été réalisée en utilisant une puce oligonucléotides Agilent 244K G4411B microarray (Agilent Technologies). Pour cette puce, le seuil de détection d'une anomalie est de 10 Kb.

Les ADN sont extraits grâce à partir de leucocytes grâce au kit QuiaAmp DNA Midi (Quiagen) selon les instructions du fabricant. Les ADN sont ensuite quantifiés par la technique de fluorescence SYBR Green. La validation de la quantité d'ADN est réalisée en comparant un ADN contrôle (Promega) et un ADN test sur un Bioanalyser (Agilent Technologies).

Chaque expérience est faite en duplicat en utilisant une procédure d'échange de marquages. Sur une lame, les ADN hybridés sont : l'ADN marqué par random priming par la carbocyanine 5 (Cy5) et l'ADN référence contrôle par la carbocyanine 3 (Cy3), alors que sur l'autre lame dupliquée les marquages couleur sont inversés. Les ADN marqués sont purifiés par précipitation alcoolique. Le mélange des 2 ADN marqués est hybridé en équimolarité sur la lame où sont "spotées" les puces oligonucléotides. Après hybridation des ADN sur les puces, les lames sont scannées sur un scanner Agilent G2565 BA DNA microarray (Molecular Devices). Les intensités de fluorescence sont analysées grâce au logiciel Feature Extraction 9.1.3. Les données brutes sont ensuite importées et analysées grâce au logiciel CGH Analytics 3.3.1. Les aberrations sont détectées par l'algorithme ADM2 et un filtre prenant un minimum de 5 sondes ainsi que  $\text{abs}(\log_2\text{Ratio}) > 0,3$ . Les segments aberrants sont reconsidérés individuellement en utilisant la version GRCh37 hg10 de UCSC.

La deuxième CGH a été réalisée avec une puce Sure Print G3 4x180K G4125A microarray (Agilent Technologies) dont le design des oligonucléotides a été réalisé afin d'enrichir spécifiquement en oligonucléotides la région génomique du gène *NOX5* ainsi que les régions 5'UTR et 3'UTR à 1 Mb de part et d'autre du gène. Le seuil de détection d'une anomalie de la puce 180K est de 15 à 30 Kb. Avec l'enrichissement spécifique, le seuil de détection d'une anomalie sur le gène *NOX5* est de 100 pb.

## X. TRANSCRIPTOME

Le transcriptome désigne l'ensemble des ARNm transcrits à partir du génome. L'analyse du transcriptome d'une population cellulaire permet d'identifier et de quantifier les produits de l'expression des gènes dans ces cellules.

Nous avons réalisé deux études du transcriptome successives sur des ARN (5 µg) extraits à partir de fibroblastes de patients en culture ainsi que 5 contrôles pour la première analyse et 4 contrôles pour la deuxième analyse.

Les analyses transcriptomiques ont été effectuées sur des puces Affymetrix Human Genome HGU133 Plus2 qui comporte 54674 sondes ciblant plus de 19500 transcrits et permettant d'étudier l'expression d'environ 38500 gènes.

En un premier lieu, les échantillons d'ARN sont transformés en ARN complémentaire (ARNc) par transcription *in vitro*. Ces ARNc sont fragmentés, puis marqués par la biotine pour être récupérés. Ils sont ensuite hybridés avec des oligonucléotides spécifiques. Une sonde fluorescente se liant à la biotine est ajoutée, puis la puce est ensuite scannée ce qui permet d'obtenir des niveaux de fluorescence pour chacune des sondes utilisées. Ces niveaux de fluorescence sont directement liés à l'abondance des fragments d'ARNc hybridés avec leurs sondes.

Les sondes Perfect Match (PM) sont des oligonucléotides constitués de 25 bases qui mesurent l'expression d'une séquence génomique spécifique. Afin d'éliminer le bruit de fond lié essentiellement à la fixation non spécifique de fragments d'ARNc sur certaines sondes, d'autres sondes sont utilisées pour mesurer la fixation non spécifique au sein de la puce. Ces sondes sont les Mis-Match (MM) et sont identiques aux PM à l'exception du 13<sup>ème</sup> nucléotide qui est remplacé par la base complémentaire. La valeur du « vrai » signal est ainsi obtenue en

soustrayant le signal des sondes MM de celui des sondes PM. Toutefois, le signal des sondes MM est parfois supérieur à celui des sondes PM, indiquant par là une détection de vrai signal en plus du bruit de fond, et se traduisant par des valeurs de signal négatives.

L'analyse débute par une étape de normalisation RMA (Robust Multi-arrayAverage) permettant de s'affranchir des biais techniques tout en préservant au mieux la variabilité biologique. La normalisation utilisée est GeneChip RMA (GC-RMA) qui prend en compte l'affinité des sondes spécifiques PM et leur contenu en GC, ce qui permet de déterminer de façon plus précise l'intensité du « vrai » signal. Après réduction du bruit de fond, une étape de normalisation permet la comparaison des sondes entre elles et leur analyse globale. Enfin, ces données sont converties en mesures d'expression grâce au logiciel GeneSpring.

En parallèle, l'analyse qualitative de chaque sonde a été effectuée avec le logiciel R par la méthode mas5 (Affymetrix Microarray Suite). La comparaison statistique des PM (perfect match) et MM (mis match) d'un probe set permet d'estimer une mesure de confiance traduite par les flags P (présent), M (marginal) et A (absent).

Une première étape d'analyse est dite non supervisée et permet de donner une idée sur les groupes naturels qui se forment en prenant en compte l'ensemble des lames. Cette analyse est effectuée par clustering de l'ensemble des lames. Les clusterings sont calculés à partir de la corrélation de Spearman.

Vient ensuite l'analyse supervisée qui sélectionne les gènes selon leur différentiel d'expression pour répondre aux questions posées. Chaque lame de patient a été comparée au groupe contrôle par le test « one sided Student » suivi de corrections statistiques de faux positifs Benjamini-Hochberg et Bonferroni. L'analyse est effectuée avec le logiciel R (R project for Statistical Computing).

Les résultats sont donnés sous la forme de listes de sondes annotées, associées à une estimation statistique de la fiabilité de la variation d'expression mesurées (pvalue), une mesure de son amplitude (ratio) et une mesure de la fiabilité du signal (flags).

Pour l'interprétation des listes en termes de réseau, de fonctions biologiques enrichies et de voies de signalisation nous avons utilisé le logiciel Ingenuity.

La partie expérimentale a été réalisée par la plateforme génomique de l'Institut Imagine et l'analyse informatique par la plateforme bioinformatique Paris-Descartes.

## XI. TRANSFECTION DE FIBROBLASTES

Les ADNc codant pour la forme mitochondriale (NOX5mt) et la forme *full length* (NOX5FL) de la protéine NOX5 sauvage ont été clonés dans le vecteur d'expression pCDNA3.1/HisA (Invitrogen).

Les fibroblastes du patient IA1, préalablement immortalisés par l'antigène T du virus SV40 (pLAS, Invitrogen), sont trypsinés et centrifugés puis resuspendus dans 400  $\mu$ L de milieu. 4  $\mu$ g de plasmide ont été ajoutés à la suspension cellulaire et ce mélange a été placé dans une cuve d'électroporation de 4 millimètres de largeur (Biorad). Les conditions d'électroporation sont les suivantes : 250V ; capacité = 1500  $\mu$ F ; résistance =  $+\infty$ . Après l'électroporation, le contenu de la cuve a été mélangé à 10 mL de milieu DMEM et mis dans une flasque T75. La culture cellulaire a été continuée pendant 48 heures pour permettre l'adhérence des cellules dans la flasque et l'expression du plasmide transfecté. Les cellules immortalisées sont ensuite transfectées avec le plasmide d'intérêt pCDNA3.1-NOX5mt ou pCDNA3.1-NOX5FL. Les cellules sont alors cultivées dans du DMEM contenant de la Geneticin G418 (Invitrogen) à une concentration finale de 300  $\mu$ g/mL pendant 3 semaines, afin de sélectionner les cellules transfectées.

## XII. ETUDE *IN VITRO* DE LA TRADUCTION MITOCHONDRIALE

Chez les patients pour lesquels nous avons identifié des mutations de gènes impliqués dans la traduction mitochondriale, une étude *in vitro* de la traduction mitochondriale a été réalisée. Le principe est le suivant : les cellules des patients sont cultivées dans un milieu comportant de l'émétine afin de bloquer la traduction cytosolique. Un *pulse* avec de la méthionine radioactive marquée au  $^{35}\text{S}$  est réalisé, suivi d'un *chase* avec de la méthionine froide. Les protéines totales sont ensuite extraites et déposées sur un gel d'acrylamide dénaturant, qui est séché puis révélé. Les protéines marquées sont celles qui ont incorporé la radioactivité, donc celles synthétisées par la mitochondrie.

En pratique, les fibroblastes en culture sont incubés avec un milieu DMEM sans méthionine 20 min, puis supplémenté avec 250  $\mu$ Ci de méthionine [ $^{35}\text{S}$ ] et 100  $\mu$ g/mL d'émétine pendant 45 min à 37°C. Les fibroblastes sont ensuite lavés 10 min dans du milieu DMEM contenant 30  $\mu$ g/mL de méthionine froide.

Les protéines totales (40 µg) sont extraites et incubées pendant 10 min dans du PBS à 2% de Lauryl-maltoside et 1X PIC (*Protease Inhibitor Cocktail*) (Sigma). L'ensemble est centrifugé 10 min à 13000 g pour éliminer le matériel non solubilisé. Le surnageant est incubé dans l'urée 8 M pendant 15 min à 37°C. Le tampon de charge est ajouté aux échantillons pour une concentration finale de 100 mM de Tris HCl, (pH 6.8), 20% de glycérol, 1% de SDS, 0.02% de bleu de Coomassie G-250, 1% de mercaptoéthanol et 1 mM de DTT (dithiothréitol). Les échantillons sont déposés sur un gel SDS-polyacrylamide à 16% contenant 8 M d'urée. Après migration, le gel est séché 2 h à 80°C puis exposé avec un film Amersham Hyperfilm<sup>TM</sup> MP pendant 3 jours.

### **XIII. BN-PAGE**

L'étude en BN-PAGE (*Blue Native-Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) de la chaîne respiratoire a été mis au point en 1991 (Schagger and von Jagow 1991). Cette technique permet d'étudier les complexes de la chaîne respiratoire dans leur forme native.

L'isolement des complexes de la chaîne respiratoire est délicat car ce sont des protéines membranaires et hydrophobes ne pouvant être séparées qu'au moyen de détergents. Par ailleurs, ces complexes sont constitués de multiples sous-unités risquant de se dissocier lors de la migration électrophorétique. Enfin, ces complexes sont eux-mêmes organisés en super complexes. Pour toutes ces raisons, la concentration et le type de détergents utilisés sont primordiaux.

Un détergent léger est donc utilisé pour dissocier les complexes (actuellement la digitonine). Le bleu de Coomassie anionique va par ailleurs introduire une charge et permettre la mobilité électrophorétique des complexes. La migration se fait dans un gel de polyacrylamide avec gradient pour une séparation optimale des complexes dans leur forme native (Nijtmans, Henderson et al. 2002; Wittig, Braun et al. 2006; Calvaruso, Smeitink et al. 2008).

L'isolement de la fraction de mitoplastes est réalisé sur d'un culot de fibroblastes obtenu à partir d'une flasque T75 est mis en suspension dans 100 µL de PBS froid. Après addition de 100 µL de digitonine, les fibroblastes sont incubés 15 min dans la glace. On ajoute ensuite 1 mL de PBS puis l'ensemble est centrifugé à 13000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est jeté et le culot lavé avec 1 mL de PBS froid puis centrifugé à 13000 g pendant 5 min à 4°C. Un second lavage est

effectué dans les mêmes conditions. Le surnageant est éliminé, et à cette étape le culot peut être congelé à -80°C pendant plusieurs mois si on ne désire pas poursuivre l'extraction.

Les complexes OXPPOS de la chaîne respiratoire sont ensuite isolés. Le culot est mis en suspension dans 80 µL de solution d'ACBT et de Lauryl Maltoside (70µL ACBT /tube, 10µL LM /tube) et mis à incuber 10 min dans la glace. L'ensemble est centrifugé à 13000 g pendant 30 min à 4°C. Au surnageant sont ajoutés 15 µL de tampon de charge et les échantillons peuvent être conservés à -80°C. Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (Sigma Aldrich).

20 µg de protéines sont chargées sur un gel NuPAGE 4-12% Bis-Tris (Invitrogen), après addition d'1/20<sup>ème</sup> de volume de Serva Blue G (Bleu de Coomassie G250) par échantillon. La migration se fait dans du tampon de migration Anode (Bis-Tris 50 mM) et Cathode A (Tricine 50 mM, Bis-Tris 15 mM, Serva Blue G 0,02%), à 100 V. Après 2 heures de migration, le tampon de migration Cathode A est remplacé par du tampon Cathode B (Tricine 50 mM, Bis-Tris 15 mM) afin d'éliminer au maximum la coloration bleue, pendant 2 heures.

Une fois la migration terminée, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF Amersham Hybond™-P (GE Healthcare) Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane PVDF (Sigma Aldrich) par la technique de transfert liquide. Le transfert des protéines sur la membrane se fait à 100 V (~150 mA) pendant 1h30. La membrane est ensuite lavée dans du PBS-Tween 0,1%, puis les protéines sont fixées sur la membrane dans une solution d'acide acétique 8% pendant 15 min. Après deux lavages au PBS-Tween 0,1%, la membrane est saturée par incubation dans une solution de blocage PBS-Tween 0,1% contenant 5% de lait écrémé en poudre pendant 1 heure à température ambiante.

Les anticorps primaires utilisés sont anti-GRIM19 (1 µg/mL, Mitosciences), anti-70KDa (0,1 µg/mL, Mitosciences), anti-Core2 (1 µg/mL, Mitosciences), anti-CoxI (1 µg/mL, Mitosciences) et anti-CVβ (1 µg/mL, Mitosciences).

Les anticorps primaires sont dilués dans la solution de blocage et incubés sous agitation 2 h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C. L'anticorps secondaire, couplé à l'enzyme HRP (*Horse radish peroxidase*), est dilué au 1/10000<sup>e</sup> dans du PBS-Tween 0,1% et incubé sous agitation pendant 1 h à température ambiante.

Le signal émis par les anticorps secondaires hybridés à la membrane est révélé par ECL (*Electro Chimio Luminescence*) avec le réactif Western Lightning™ Plus-ECL (Pierce). La membrane est

placée dans une solution d'ECL pendant 5 min puis révélée grâce à l'appareil de détection ChemiDoc™ XRS+ System (Biorad). Les données sont traitées par le logiciel Image Lab

## **XIV. EXTRACTION DE PROTEINES ET SDS-PAGE**

### **1. Extraction de protéines totales**

Le culot cellulaire de fibroblastes d'une flasque T75 est repris et homogénéisé dans 100 µL de tampon de lyse : 50 mM Tris HCl pH 8,4, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40, 2 mM DTT, PIC 1X (Sigma). Après une incubation de 30 minutes dans la glace, la solution protéique est centrifugée à 15000g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est récupéré, aliquoté et conservé à -80°C.

### **2. Extraction de mitoplastes**

Pour une flasque T75 de cellules confluentes, les fractions de mitoplastes sont obtenues par dissociation dans 100 µL de PBS, puis 100 µL de digitonine. L'ensemble est incubé 10 min dans la glace puis, après ajout de 1 mL de PBS, centrifugé à 13000g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est éliminé. Deux lavages avec 1 mL de PBS sont effectués. Après élimination du dernier surnageant, le culot est resuspendu dans 50 µL de tampon de lyse : 50 mM Tris HCl pH 8,4, 300 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0,5% NP-40, 2 mM DTT, PIC 1X (Sigma). LA solution protéique est incubée 30 min dans la glace puis centrifugée à 13000g pendant 15 min à 4°C. Le surnageant est récupéré, aliquoté et conservé à -80°C.

### **3. Fractionnement cellulaire**

Le culot de fibroblastes (obtenu à partir de 6 T75) est resuspendu dans 500 µL de Mitochondrial Buffer (MB : 210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM Hepes pH 7,5), supplémenté avec du PIC 1X (Sigma). La suspension cellulaire est transférée dans un potter et les cellules sont broyées par 15 coups dans l'homogénéisateur hermétique. La suspension cellulaire est centrifugée à 1000 g pendant 10 min à 4°C afin de séparer le culot de mitochondries du cytosol Le surnageant (SN1) est récupéré et le culot resuspendu dans 300 µL de MB et PIC 1X. Les cellules sont à nouveau deux fois de plus broyées deux fois par 15 coups dans l'homogénéisateur hermétique et la suspension cellulaire centrifugée à 1000 g pendant 10 min à



4°C, ceci afin d'optimiser l'enrichissement. Les surnageants SN2 et SN3 sont mis en commun avec SN1. Les trois surnageants réunis sont ensuite centrifugés à 15000g pendant 20 min à 4°C. Le surnageant contient le cytoplasme et peut être conservé à -80°C. Le culot contenant les mitochondries est resuspendu dans 50 µL de MB avec du PIC 1X et aliquoté pour le conserver à -80°C.

Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford (Sigma Aldrich). Le tampon de charge est ajouté aux échantillons pour une concentration finale de 100 mM de Tris HCl, (pH 6,8), 20% de glycérol, 1% de SDS, 0,02% de bleu de Coomassie G-250, 1% de mercaptoéthanol et 1 mM de DTT et les échantillons sont dénaturés à la chaleur 5 min à 95°C.

### **4. SDS-PAGE**

L'analyse en SDS-PAGE est réalisée sur des extraits de mitoplastes, de fractions cellulaires cytoplasmiques et mitochondriales et de protéines totales obtenus à partir de culots de fibroblastes.

Pour chaque échantillon, les protéines sont déposés sur des gels gradient NuPAGE 4-12% Bis-Tris Gel (Invitrogen) ou des gels gradients TGX 4-15% (Biorad). La migration se fait dans un tampon de migration (MOPS 1X avec ajout de 500 µL d'antioxydants) pendant 2 h à 100 V. Le transfert est réalisé grâce à l'appareil de transfert Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell (Biorad) pendant 30 min à 15 V. Les protéines sont fixées sur la membrane par une solution d'acide acétique 8% pendant 15 min. Avant l'étape d'immunodétection, la membrane est saturée par incubation dans une solution de blocage PBS-Tween 0,1% contenant 5% de lait écrémé, pendant 1 heure à température ambiante

Nous avons utilisé les anticorps primaires suivants : anti-CI-Grim19, CII-SDHA, CIII-core2, CIV-COXI, CIV-COXII, CV-subunit β, NOX5, MRPS22, MRPL3, PDHE1, actine, MAPK.

L'anticorps secondaire utilisé est couplé à la HRP et dirigé, selon les besoins, contre les anticorps de souris, de lapin ou de chèvre (Abcam).

## XV. ANALYSE *IN SILICO*

Les séquences des gènes humains ont été obtenues à l'aide des bases de données UCSC Genome Browser (<http://genome.ucsc.edu/>) et Ensembl (<http://www.ensembl.org/>).

La recherche d'une séquence d'adressage mitochondrial a été effectuée au moyen des logiciels de prédiction TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>), Mitoprot (<http://ihg.gsf.de/ihg/mitoprot.html>), Predotar (<http://www.inra.fr/predotar/>) et Mitopred (<http://mitopred.sdsc.edu/>).

La recherche de gènes humains codant pour des protéines homologues à des protéines de synthèse des ARNt, de modification des ARNt ou de protéines ribosomales de la levure a été effectuée par Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

La recherche des séquences promotrices et de polyadénylation a été effectuée au moyen des logiciels de prédictions suivants : Neural Network Promoter Prediction Proscan ([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html)), Promoser (<http://biowulf.bu.edu/zlab/PromoSer/>), Poly(A) Signal Miner (<http://dnafsminer.bic.nus.edu.sg/PolyA.html>), et les algorithmes TSSG, NSITE et POLYAH (<http://linux1.softberry.com/berry.phtml?topic=index&group=programs&subgroup=promoter>).



# *RESULTATS*

---



## COHORTE DE PATIENTS

Afin d'identifier de nouveaux gènes d'atteinte hépatique d'origine mitochondriale, nous avons constitué, en combinant des patients des hôpitaux Necker-Enfants Malades et du Kremlin-Bicêtre, une cohorte de 70 patients présentant une atteinte hépatique mitochondriale associée ou non à une atteinte neurologique, et ne présentant pas de délétion ou de déplétion majeure de l'ADNmt (<10%) dans le foie. Pour les patients pour lesquels nous ne disposons plus de biopsie de foie pour rechercher une déplétion, les gènes *DGUOK*, *POLG* et *MPV17* responsables d'atteintes hépatiques mitochondriales avec déplétion ont été exclus. Nous disposons pour tous ces patients de fibroblastes, qui nous ont permis de réaliser les différentes études présentées dans les résultats de ce travail.

Le Tableau 4 présente les caractéristiques cliniques ainsi que les méthodes employées pour l'étude de cette cohorte de 70 patients.

## Atteinte hépatique

Patients	Méthode d'étude				Clinique																	
	Exclusion des gènes <i>DGUK, POLG, MPV17, PEO1</i> <i>GFM1, LARS, TSM</i> et <i>TRMU</i>	Cartographie génétique	Séquençage exome	Transcriptome	Sexe	Consanguinité	Famille multiplex	RCIU	Age de début	Age de décès	Signe d'appel	Ictère	ASAT	ALAT	PAL	YGT	Signes neurologiques	Autres symptômes	Hypoglycémie	Hyperlactacidémie	Déficit de la CR dans le foie	Transplantation hépatique
1/ AH1		+		+	M	+ 1/16	-	J1	3M	Insuffisance hépatocellulaire, hypoglycémie	+	178	93	nd	nd	-	-	-	+	+	Cl+IV	-
2				+	M	-	-	6S	2M	Insuffisance hépatocellulaire, acidose lactique	-	1544	852	nd	nd	-	-	-	+	+	Multiple	-
3/ AZ1		+		+	M	+ 1/32	-	J2	4M	Ictère, insuffisance hépatocellulaire, hépatomégalie, hypoglycémie	+	nd	229	nd	nd	-	Hypotonie axiale, détresse respiratoire, troubles de la déglutition	Cédèmes, tubulopathie	+	+	nd	-
4	+			+	M	-	-	J21	J35	Ictère, insuffisance hépatocellulaire, hypoglycémie, ascite	+	200	88	nd	25	-	-	Suivi oculaire difficile	+	-	Cl+IV	-
5	+			+	F	-	-	2M	4M	Insuffisance hépatocellulaire	-	880	1043	280	49	-	Hypotrophie	Thrombopénie, retard de croissance	-	-	Multiple	-
6/ CO1	+	+	+	+	F	-	-	nd	2M	Insuffisance hépatocellulaire	+	nd	nd	nd	nd	Oui	Oui	-	-	+	Multiple	-
7/ CO2	+	+	+	+	F	-	-	1M	2M	Ictère, insuffisance hépatocellulaire	+	800	500	831	30	Oui	Oui	-	-	+	Multiple	-
8				+	M	-	-	J1	J11	Coma métabolique, Hyperlactacidémie,	-	nd	nd	nd	nd	-	Hypotonie axiale	-	-	+	Cl+IV	-

## Atteinte hépatique

Patients	Méthode d'étude				Clinique																		
	Exclusion des gènes <i>DGUK, POLG, MPV17, PEO1</i> <i>GFM1, LARS, TSM et TRMU</i>	Cartographie génétique	Séquençage exome	Transcriptome	Sexe	Consanguinité	Famille multiplex	RCIU	Age de début	Age de décès	Signe d'appel	Ictère	ASAT	ALAT	PAL	YGT	Signes neurologiques	Autres symptômes	Hypoglycémie	Hyperlactacidémie	Déficit de la CR dans le foie	Transplantation hépatique	
9				+	M	-	-	+	J4	5M	Ictère, insuffisance hépatocellulaire, thrombopénie	+	128	68	nd	75	-	Hypertrophie cardiaque	-	-	Cl+IV	-	
10/ IA1	+		+	+	F	-	-	-	2M	3ANS	Ictère, insuffisance hépatocellulaire, hypotonie, hépatomégalie	+	58	78	420	266	Hypotonie axiale et périphérique	-	-	CIV	+	-	
11	+		+	+	M	-	-	-	2M	7M	Ictère, hypoglycémie, mouvements anormaux des yeux	+	104	130	312	30	Hypotonie	Cécité, nystagmus	+	+	Multiple	-	
12			+	+	F	-	+	+	J3	J35	Insuffisance hépatocellulaire, hypoglycémie	+	nd	nd	nd	nd	Hypotonie	-	-	Cl+IV	+	-	
13			+	+	F	-	+	+	J1	16M	Ictère, insuffisance hépatocellulaire, hypoglycémie, hypotonie	+	nd	nd	nd	nd	Hypotonie, retard de croissance	-	-	Cl+IV	+	-	
14			+	+	F	-	-	-	J1	4M	Insuffisance hépatocellulaire, hypoglycémie	-	nd	nd	nd	nd	-	-	-	Multiple	+	-	
15			+	+	M	-	-	-	J1	J6	Hypotrophie, détresse respiratoire, acidoose métabolique	-	nd	nd	nd	nd	Hypotonie du tronc, hypertrophie périphérique, coma	Anémie, pas de contact visuel	-	+	Multiple	-	



## Atteinte hépatique

Patients	Méthode d'étude				Clinique																	
	Exclusion des gènes DGUOK,POLG,MPV17,PEO1 GFM1,LARS,TSM et TRMU	Cartographie génétique	Séquençage exome	Transcriptome	Sexe	Consanguinité	Famille multiplex	RCIU	Age de début	Age de décès	Signe d'appel	Ictère	ASAT	ALAT	PAL	YGT	Signes neurologiques	Autres symptômes	Hypoglycémie	Hyperlactacidémie	Déficit de la CR dans le foie	Transplantation hépatique
16/ KE1	+	+	+	+	M	+ 1/64	+	+	J1	1M	Insuffisance hépatocellulaire	+	45	135	nd	40	Hypotonie	Troubles hématologiques et digestifs	-	+	Multiple	-
17/ KE2	+	+	+		M	+ 1/64	+	J2	1M	Insuffisance hépatocellulaire	+	nd	nd	nd	nd	Hypotonie	-	-	-	+	nd	-
18/ KE3	+	+	+		M	+ 1/64	-	JJ	13M	Insuffisance hépatocellulaire	+	nd	nd	nd	nd	Hypotonie	-	-	-	+	Multiple	-
19	+			+	F	-	+	J1	J3	Insuffisance hépatocellulaire	-	nd	nd	nd	nd	Hypotonie	Suivi oculaire difficile	-	-	+	Multiple	-
20	+		+	+	M	+	-	8M	27M	Hépatomégalie	-	390	438	277	84	Hypotonie	Diabète insulinodépendant, surdité, prurit	-	-	Multiple	26M	
21	+		+	+	M	-	+	J1	J9	Vomissements, ictère, thrombopénie, hypoglycémie	+	82	40	452	34	-	Thrombopénie (purpura), troubles digestifs	+	+	Multiple	-	
22	+		+	+	M	-	-	J1	En vie	Ictère, hypoglycémie	+	80	60	270	100	-	-	+	+	CI	-	
23	+		+	+	M	-	+	J2	En vie	Ictère, cholestase	+	72	44	471	52	-	-	+	+	CI	-	
24	+		+	+	F	-	-	7M	dcd	Vomissements, ictère, insuffisance hépatocellulaire	+	680	640	287	31	Convulsions	Troubles digestifs	+	-	CIV	4M	
25	+		+	+	M	-	+	J1	dcd	Spasticité	+	127	11	nd	776	Hypotonie	-	-	+	CI	-	

## Atteinte hépatique

Patients	Méthode d'étude				Clinique																	
	Exclusion des gènes DGUOK, POLG, MPV17, PEO1 GFM1, LARS, TSM et TRMU	Cartographie génétique	Séquençage exome	Transcriptome	Sexe	Consanguinité	Famille multiplex	RCIU	Age de début	Age de décès	Signe d'appel	Ictère	ASAT	ALAT	PAL	YGT	Signes neurologiques	Autres symptômes	Hypoglycémie	Hyperlactacidémie	Déficit de la CR dans le foie	Transplantation hépatique
26/ B11	+		+	+	F	-	-	+	J1	3M	Ictère, selles blanches	+	146	64	1354	72	Hypotonie, convulsions	Anémie, retard de croissance	-	+	CIV	-
27	+		+	+	F	-	-	-	J1	8ANS	Ictère, mauvaise croissance, hypoglycémie	+	200	136	554	9595	-	-	+	-	Multiple	7ANS
28	+		+	+	M	-	+	+	J1	3M	Ictère, insuffisance hépatocellulaire	+	420	192	416	100	Hypotonie axiale	-	-	-	Multiple	-
29	+		+	+	F	-	-	-	J5	En vie	Ictère, insuffisance hépatocellulaire, septicémie	+	140	40	277	26	Hypotonie axiale	-	+	-	Multiple	-
30	+		+	+	M	-	-	-	4,5M	En vie, 15ANS	Ictère, décoloration des selles, hépatite fulminante	+	840	1760	277	35	Hypotonie	-	-	-	Multiple	6M
31	+		+	+	F	-	-	-	J1	16M	Encéphalopathie	+	nd	nd	nd	nd	Hypotonie	-	-	+	Multiple	-
32	+		+	+	F	-	+	-	1M	14M	Ictère, vomissements, hypotonie	+	480	360	554	86	Somnolence, retard moteur, hypotonie, hypertension périphérique	Troubles cardiaques et digestifs	-	-	CIII	-
33	+		+	+	F	-	-	-	J1	4M	Insuffisance hépatocellulaire	-	nd	nd	nd	nd	-	-	-	+	Multiple	-
34			+	+	M	-	-	+	J1	9M	Cholestase, insuffisance hépatocellulaire	+	88	19	nd	nd	-	-	-	+	Multiple	8M

## Atteinte hépatique

Patients	Méthode d'étude				Clinique																		
	Exclusion des gènes DGUOK,POLG,MPV17,PEO1 GFM1,LARS,TSM et TRMU	Cartographie génétique	Séquençage exome	Transcriptome	Sexe	Consanguinité	Famille multiplex	RCIU	Age de début	Age de décès	Signe d'appel	Ictère	ASAT	ALAT	PAL	YGT	Signes neurologiques	Autres symptômes	Hypoglycémie	Hyperlactacidémie	Déficit de la CR dans le foie	Transplantation hépatique	
35			+	+	F	-	-	-	J2	10M	Ictère, stagnation pondérale, hypotonie	+	344	388	nd	100	Hypotonie	Cécité	-	+	Multiple	-	
36	+		+	+	M	-	+	J2	En vie, 15ANS	Convulsions, insuffisance hépatocellulaire, ictère cholestatique	+	183	144	528	38	Hypotonie axiale	Hernie inguinale bilatérale	+	+	CIV	4ANS		
37	+		+	+	F	-	-	2M	En vie	Hépatosplénomégalie	-	60	44	416	100	-	-	-	-	+	CI	-	
38	+		+	+	M	-	-	J1	5M	Ictère, acidose lactique, hypotonie, détresse respiratoire	+	96	56	240	79	Hypotonie, mouvements anormaux des yeux	Pancytopenie	-	-	+	Multiple	-	
39	+		+	+	F	+	-	3M	9M	Insuffisance hépatocellulaire, ictère, cassure pondérale	+	244	176	277	160	Hypotonie	-	-	-	+	CIV	-	
40	+		+	+	F	-	-	J1	J28	Ictère, hépatosplénomégalie	+	469	281	273	41	-	Purpura	-	-	+	Multiple	-	
41	+		+	+	F	-	+	J17	En vie	Ascite, hypoglycémie	+	128	40	420	67	-	Œdèmes, ascite	+	+	CI	-		
42	+		+	+	M	-	+	J15	3M	Ictère, insuffisance hépatocellulaire, ascite	+	98	25	480	23	-	Œdèmes généralisés, télangiectasies	-	-	Multiple	-		
43	+		+	+	F	-	-	1M	J45	Ictère, coma hypoglycémique	+	360	120	1002	25	-	Anémie	+	+	nd	-		

## Atteinte hépatique

Patients	Méthode d'étude				Clinique																		
	Exclusion des gènes DGUOK, POLG, MPV17, PEO1 GFM1, LARS, TSM et TRMU	Cartographie génétique	Séquençage exome	Transcriptome	Sexe	Consanguinité	Famille multiplex	RCIU	Age de début	Age de décès	Signe d'appel	Ictère	ASAT	ALAT	PAL	YGT	Signes neurologiques	Autres symptômes	Hypoglycémie	Hyperlactacidémie	Déficit de la CR dans le foie	Transplantation hépatique	
44	+		+	+	F	-	+	-	13M	En vie	Ictère, insuffisance hépatocellulaire, septicémie	+	520	356	1056	55	-	-	-	+	CIV	-	
45	+		+		M	-	+	-	13M	En vie, 15ANS	Ictère, insuffisance hépatocellulaire	+	600	344	1219	90	-	-	-	+	CIV	9M	
46			+		M	+	-	-	13M	En vie	Cirrhose micronodulaire, cholestase et cytolyse hépatiques, hyperlactacidémie	-	nd	nd	nd	nd	Hypotonie	-	+	Multiple	-		
47			+		F	+	-	-	J1	7M	Ictère, insuffisance hépatocellulaire, hyperlactémie	+	53	50	480	100	-	-	-	+	Multiple	-	
48	+	+			M	+	+	-	J1	4ANS	Hypoglycémie, insuffisance hépatocellulaire, hépatosplénomégalie	-	nd	90	nd	nd	Régression psychomotrice, hypotonie axiale, épilepsie myoclonique	-	+	Multiple	-		
49	+	+			-	+	-	-	J15	dcd	Acidose lactique, insuffisance hépatique	-	nd	nd	nd	nd	Hypotonie	Cardiomyopathie dilatée	-	+	Multiple	-	
50	+	+			-	+	-	-	J1	dcd	Cytolyse, cholestase hépatique, hyperlactacidémie	-	nd	nd	nd	nd	-	Atrophie microvillositaire	-	+	Multiple	-	

## Atteinte hépatique

Patients	Méthode d'étude				Clinique																		
	Exclusion des gènes DGUOK, POLG, MPV17, PEO1 GFM1, LARS, TSM et TRMU	Cartographie génétique	Séquençage exome	Transcriptome	Sexe	Consanguinité	Famille multiple	RCIU	Age de début	Age de décès	Signe d'appel	Ictère	ASAT	ALAT	PAL	YGT	Signes neurologiques	Autres symptômes	Hypoglycémie	Hyperlactacidémie	Déficit de la CR dans le foie	Transplantation hépatique	
51	+	+			F	+ 1/16	+	-	3M	18M	Insuffisance hépatique, hypotonie, difficultés d'alimentation	-	nd	60	nd	nd	Hypotonie périphérique	Retard psychomoteur	-	+	Multiple	-	
52	+	+			F	+ 1/64	+	-	7M	dcd	Cytolyse hépatique, encéphalopathie convulsivante	-	nd	nd	nd	nd	Hypotonie axiale, épilepsie partielle continue	Retard de croissance	-	+	CIV	-	
53				+	M	-	-	-	J1	En vie	Insuffisance hépatocellulaire, acidose lactique, hypoglycémie	-	152	172	nd	81	-	Détresse respiratoire		-	+	CI+IV	-
54				+	M	-	+	-	J1	J11	Détresse respiratoire	-	166	49	nd	546	Hypotonie, convulsions	Anémie	-	+	Multiple	-	
55				+	F	-	-	-	6S	En vie	Ictère	+	158	135	277	24	-	Guérison	+	+	CI	-	
56				+	F	-	-	-	nd	En vie	Insuffisance hépatocellulaire	-	nd	nd	nd	nd	-	-	-	+	nd	-	
57				+	M	-	-	-	J1	1M	Ictère, hypoglycémie, hypocalcémie	+	198	90	433	20	Pas de contact visuel	-	+	+	Multiple	-	
58				+	M	+	-	-	2,5M	En vie	Ictère	+	140	40	560	100	-	-	+	+	Multiple	-	
59				+	M	-	-	-	J40	En vie	Ictère, somnolence	+	nd	nd	nd	nd	Irritabilité, contact fugace	-	-	-	CI	-	

## Atteinte hépatique

Patients	Méthode d'étude				Clinique																	
	Exclusion des gènes DGUOK, POLG, MPV17, PEO1 GFM1, LARS, TSM et TRMU	Cartographie génétique	Séquençage exome	Transcriptome	Sexe	Consanguinité	Famille multiplex	RCIU	Age de début	Age de décès	Signe d'appel	Ictère	ASAT	ALAT	PAL	YGT	Signes neurologiques	Autres symptômes	Hypoglycémie	Hyperlactacidémie	Déficit de la CR dans le foie	Transplantation hépatique
60				+	F	-	-	-	16M	En vie	Insuffisance hépatocellulaire, hypoglycémie	+	240	nd	nd	nd	Coma	Hématomes	-	+	Multiple	-
61				+	F	-	+	-	4M	5M	Ictère, cholestase	+	nd	380	nd	37	-	-	-	-	CIV	-
62				+	F	-	-	+	1M	6S	Ictère	+	760	582	116	2733	Contact visuel anormal	-	-	-	Multiple	-
63				+	M	-	-	-	J1	En vie	Ictère, hypoglycémie, hépatosplénomégalie	+	600	260	560	110	Hypotonie axiale	Œdèmes sus pubien et périnéal	+	+	C+III	-
64				+	M	-	-	+	2M	6M	Ictère, nystagmus, hypotonie axiale, hypoglycémie	+	132	39	500	372	Hypotonie, nystagmus	-	-	+	Multiple	-
65				+	M	-	-	-	1M	En vie	Hépatomégalie	+	292	83	831	98	Hypotonie axiale, retard psychomoteur	Hypercholestérolémie	+	+	CIII	-
66				+	F	-	-	-	2M	En vie	Difficultés d'alimentation, vomissements, insuffisance hépatocellulaire	+	280	320	332	67	-	-	-	+	CIV	-
67				+	F	-	-	-	12M	En vie	Vomissements, ictère, insuffisance hépatocellulaire	+	300	520	295	91	Léger retard du développement	-	-	-	Multiple	-

Atteinte hépatique																						
Patients	Méthode d'étude				Clinique																	
	Exclusion des gènes DGUOK, POLG, MPV17, PEO1 GFM1, LARS, TSM et TRMU	Cartographie génétique	Séquençage exome	Transcriptome	Sexe	Consanguinité	Famille multiple	RCIU	Age de début	Age de décès	Signe d'appel	Ictère	ASAT	ALAT	PAL	YGT	Signes neurologiques	Autres symptômes	Hypoglycémie	Hyperlactacidémie	Déficit de la CR dans le foie	Transplantation hépatique
68				+	M	-	-	+	4M	En vie	Cytolyse, malaise	-	100	140	274	66	-	Vomissements isolés	-	-	CI	-
69				+	M	-	+	J1	J13	Purpura, détresse respiratoire, hépato- splénomégalie	+	335	54	124	36	-	Dysmorphie, microcéphalie, purpura	+	+	nd	-	
70/ TO1				+	M	-	-	-	J14	3M	Ictère, décoloration des selles	+	1200	380	831	100	-	-	+	+	CI+IV	-

**Tableau 4 : Caractéristiques cliniques et biologiques des patients présentant une atteinte hépatique.**

(RCIU : retard de croissance intra-utérin ; ASAT : Aspartate aminotransférase ; ALAT : Alanine aminotransférase ; PAL : phosphatases alcalines ; YGT : gamma-glutamyl-transpeptidase).

Valeurs normales : ASAT = 7-40 UI/mL, ALAT = 7-40 UI/mL, PAL = 75-240 UI/L, YGT = 6-25 UI/L

## I. *TRMU*, NOUVEAU GENE D'ATTEINTE HEPATIQUE MITOCHONDRIALE SANS DEPLETION DE L'ADN<sub>MT</sub>

Les atteintes hépatiques mitochondriales se manifestent par une insuffisance hépatique, une hyperbilirubinémie, une élévation des transaminases, une hypoglycémie et une hyperlactacidémie, souvent accompagnées d'une hypotonie, de vomissements et de difficultés d'alimentation. Une cause fréquente d'atteinte hépatique d'origine mitochondriale est une déplétion sévère (<10%) de l'ADN<sub>mt</sub> dans le foie. Les déplétions représentent environ 30% des patients et sont associées à des mutations dans les gènes *POLG*, *DGUOK*, *PEO1* et *MPV17*. Les autres patients ont un taux d'ADN<sub>mt</sub> normal dans les mitochondries de foie et les gènes causaux restent à identifier. Nous rapportons ici deux familles indépendantes dont les enfants atteints présentent une insuffisance hépatique néonatale sans déplétion de l'ADN<sub>mt</sub>, issus de parents consanguins, ainsi que 11 patients Israéliens, pour lesquels des études de cartographie par homozygotie ont été réalisées.

### 1. Patients

La famille AH est une famille multiplex consanguine d'origine algérienne (facteur de consanguinité 1/16, Figure 18).

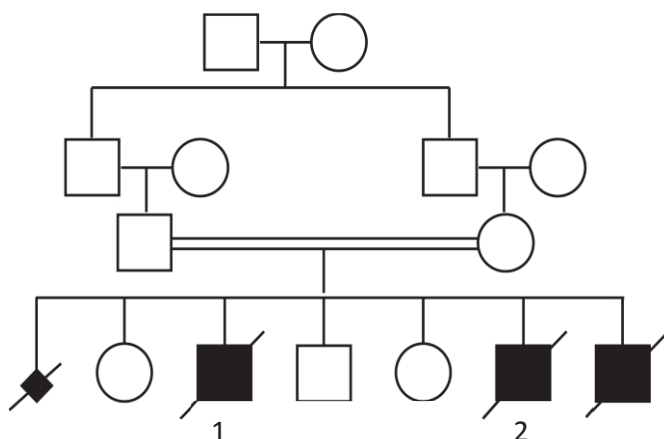


Figure 18 : Arbre généalogique de la famille AH.

Le patient 1 de la cohorte (que nous appellerons ici AH1) présente dès le premier jour de vie une insuffisance hépatique et une hypoglycémie.



Le bilan biologique montre une hyperlactacidémie (L=7 mmol/L, rapport L/P=35), une augmentation des ALAT (178 UI/L, normale entre 5 et 30) et des ASAT (93 UI/L, normale entre 10 et 40 UI/L). L'examen neurologique est normal. Il n'a pas de déplétion de l'ADNmt dans le foie. L'enzymologie montre un déficit des complexes I et IV dans l'homogénat de foie et de fibroblastes en culture. Il est décédé à 3 mois.

Le patient AH2 montre les mêmes signes cliniques que son frère.

La famille AZ est une famille consanguine multiplex originaire d'Algérie, ayant un facteur de consanguinité de 1/32 (Figure 19).

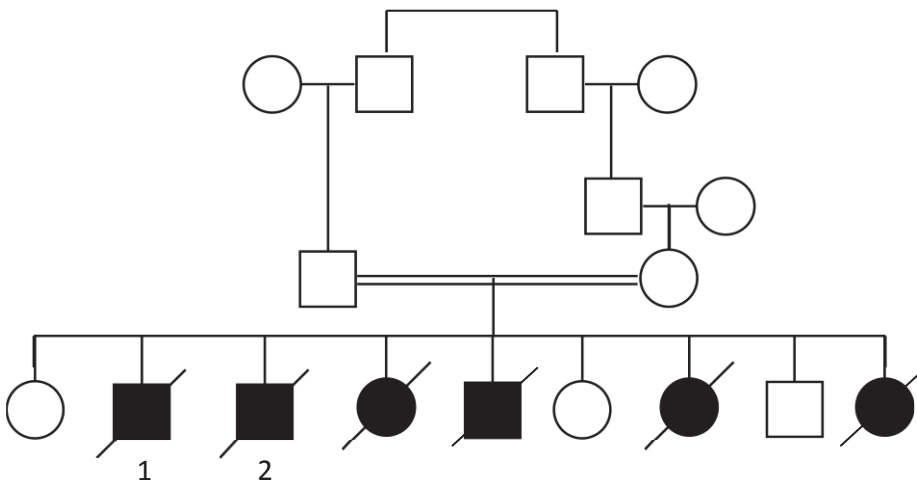


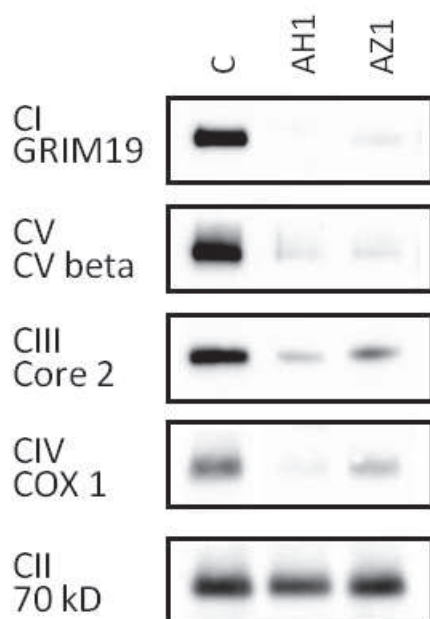
Figure 19 : Arbre généalogique de la famille AZ.

L'individu AZ1 (patient 3 de la cohorte) est né à terme. Il présente à J2 un ictère, une hypotonie axiale, des troubles de la déglutition et une détresse respiratoire avec apnée. L'examen clinique montre une hépatomégalie nette sans splénomégalie, une insuffisance hépatocellulaire, une hypoglycémie et une cytolyse (SGOT 91, SGPT 54). A J5, le bilan biologique montre une hyperlactacidémie (L=10 mmol/L, L/P=8). Sur le plan rénal, l'enfant présente une tubulopathie modérée avec une hyperaminoacidurie. D'un point de vue neurologique, il présente une hypotonie axiale ainsi que des troubles de la déglutition. Il n'a pas de déplétion de l'ADNmt dans le foie. L'enzymologie montre un déficit des complexes I et IV dans l'homogénat de foie et de fibroblastes en culture. Il est décédé à 2,5 mois dans un tableau de coma dépassé.

Le patient AZ2 présente les mêmes caractéristiques cliniques que son frère.

## 2. Etude biochimique

Nous avons réalisé une étude de l'assemblage de la chaîne respiratoire par BN-PAGE sur des mitoplastes extraits à partir des fibroblastes en culture des patients AH1 et AZ1, pour lesquels nous avons des fibroblastes. Le BN-PAGE montre un net déficit de la quantité des complexes I, III, IV et V chez les patients AH1 et AZ1 (Figure 20).



**Figure 20 :** BN-PAGE réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes des patients AH1 et AZ1 des familles AH et AZ et un contrôle (C).

*Les quantités des complexes I, III, IV et V assemblés sont diminuées chez les individus par rapport au contrôle C. Le complexe II, composé uniquement de protéines codées par le génome nucléaire, sert de témoin.*

## 3. Cartographie génétique

Un génotypage à l'aide de 1000 microsatellites (DeCODE Genetics) répartis sur l'ensemble du génome a été réalisé dans ces deux familles. Ce génotypage a été fait pour les enfants atteints AZ1 et AZ2 de la famille AZ et les deux enfants atteints AH1 et AH2 de la famille AH.

L'étude du génotypage de la famille AZ nous a permis de mettre en évidence plusieurs régions homozygotes ayant un *lod-score* inférieur à 3 et supérieur à -2 ne permettant donc pas de les exclure (Tableau 5). Le *lod-score* maximal de 2,4 a été obtenu pour la région du chromosome 9, en 9p13.2-q21.13. Ce *lod-score* est toutefois inférieur à 3, ce qui ne permet pas d'affirmer que cette région est liée à la maladie. Le séquençage de tous les gènes candidats de cette région (soit

27 gènes codant pour des protéines mitochondriales ou prédites pour avoir un adressage à la mitochondrie) n'a pas permis de mettre en évidence d'anomalies moléculaires permettant d'expliquer la maladie.

Localisation des régions d'homozygotie	Taille des régions	Lod-score
chr2:236,800,133-242,951,149	6,2 Mb	1,7
chr4:7,696,342-13,460,264	5,8 Mb	-0,6
chr9:66,281,264-79,211,316	12,9 Mb	2,4
chr10:78,500,936-85,656,566	7,2 Mb	1,4
chr11:108,980,277-114,692,511	5,7 Mb	-0,2
chr12:91,361,158-97,493,219	6,1 Mb	-0,2
chr13:1-23,806,342	23,8 Mb	0,6
chr17:29,851,500-34,516,911	4,6 Mb	-1,4
chr22:43,547,780-45,430,237	1,9 Mb	1,2

**Tableau 5 : Régions d'homozygotie pour la famille AZ obtenues grâce au génotypage DeCODE réalisé sur les enfants atteints AZ1 et AZ2.**

En ce qui concerne la famille AH, une grande région d'homozygotie de 22 Mb a été mise en évidence sur le bras long du chromosome 22 ainsi que d'autres petites régions réparties sur les autres chromosomes (Tableau 6). Le *lod-score* maximal obtenu pour cette famille est de 1,7 pour la région du chromosome 22 située en 22q12.1-q13.31.

Localisation des régions d'homozygotie	Taille des régions	Lod-score
chr6:20,378,016-25,172,470	4,8 Mb	-1,4
chr12:24,468,387-30,459,297	6 Mb	1,3
chr12:91,361,158-97,493,219	6,1 Mb	-0,3
chr17:16,255,942-29,076,570	12,7 Mb	0
chr17:29,851,500-34,516,911	4,6 Mb	1
chr22:24,847,527-46,829,776	22 Mb	1,7

**Tableau 6 : Régions d'homozygotie pour la famille AH obtenues grâce au génotypage DeCODE réalisé sur les enfants atteints AH1 et AH2.**

Nous avons recoupé les régions d'homozygotie entre ces deux familles, sous l'hypothèse d'une homogénéité génétique, et sélectionné les régions chevauchantes. Les familles AZ et AH partagent trois régions d'homozygotie chevauchantes, présentées dans le Tableau 7.

Régions d'homozygotie communes aux familles AH et AZ	Taille des régions
chr12:91,361,158-97,493,219	6,1 Mb
chr17:29,851,500-34,516,911	4,6 Mb
chr22:43,547,780-45,430,237	1,9 Mb

Tableau 7 : Régions d'homozygotie communes entre les familles AH et AZ.

La région d'homozygotie partagée entre les deux familles de 1,9 Mb de la famille AZ, incluse dans la grande région d'homozygotie de 22 Mb de la famille AH, contient un gène candidat, *TRMU* (tRNA 5-méthylaminométhyl-2-thiouridylate méthyltransférase), codant pour une protéine de modification des ARNt mitochondriaux (Figure 21).

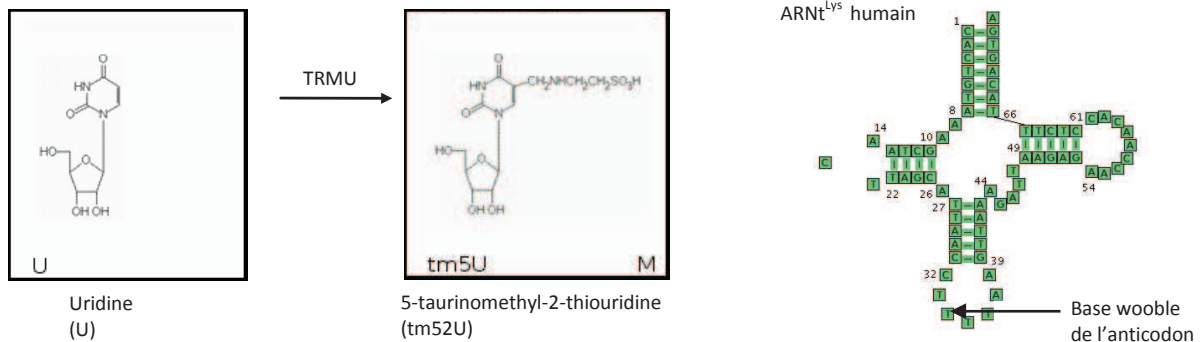


Figure 21 : Représentation schématique de la fonction de la protéine TRMU (à gauche) et modification assurée par TRMU sur l'ARNt<sup>Lys</sup> mitochondrial (à droite).

Le séquençage des 11 exons du gène *TRMU* ainsi que de leurs régions introniques flanquantes a révélé, pour les patients AH1 et AH2 de la famille AH, et les patients AZ1 et AZ2 de la famille AZ, la présence d'une transversion homozygote dans l'exon 1 (Figure 23) :

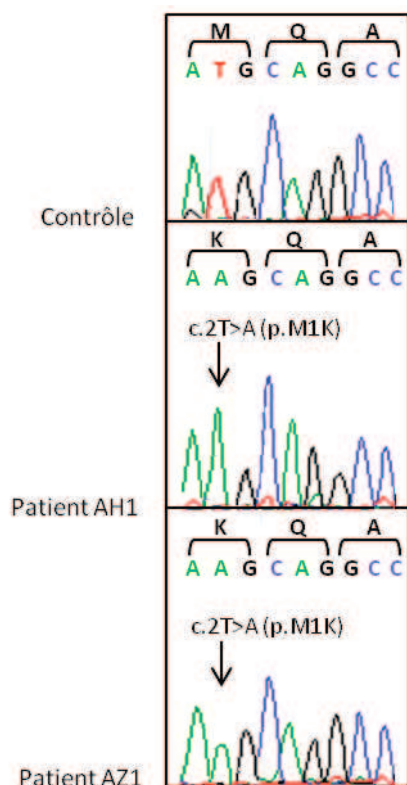


Figure 22 : Séquence du gène *TRMU* chez les patients AH1 et AZ1, montrant la substitution homozygote c.2T>A dans l'exon 1.

La transversion c.2T>A provoque le changement de la première Méthionine de la protéine (codon d'initiation de la traduction) très conservée, en Lysine p.M1K. La présence d'une même mutation dans ces deux familles pourtant indépendantes peut s'expliquer par le fait qu'elles appartiennent toutes deux à la même origine ethnique (familles algériennes). La mutation n'a pas été retrouvée dans 212 chromosomes contrôles de même origine ethnique.

Nous avons séquencé les 11 exons du gène *TRMU* ainsi que les régions introniques flanquantes pour 32 patients de notre série de 70 patients présentant une atteinte hépatique mitochondriale, afin d'évaluer la prévalence des mutations de *TRMU*.

Nous n'avons pas retrouvé d'autres mutations dans le gène *TRMU* chez ces patients, ce qui témoigne de l'extrême hétérogénéité génétique de notre cohorte.

Des mutations dans le gène *TRMU* ont été également retrouvées chez 11 patients Juifs Yéménites, Juifs Ashkénazes, ou d'origine arabe, étudiés par le laboratoire d'Orly Elpeleg (Department of Human Genetics and Metabolic Diseases, the Hebrew University Medical Center,

Jerusalem, Israel). Ces 11 patients ont le même phénotype que nos patients, à savoir une insuffisance hépatique déclarée dans la période néonatale ou dans la première année de vie (de 1 jour à 6 mois), une hyperlactacidémie, et pas de déplétion de l'ADNmt dans le foie. Deux patients sur les 11 sont décédés un mois après avoir déclaré les premiers symptômes. Les 9 autres patients ont survécu à leur épisode aigu d'atteinte hépatique en période infantile, se portent bien et n'ont pas présenté de récurrence des symptômes. Le gène *TRMU* a été identifié grâce à une cartographie par homozygotie (Human Mapping 250K Nspl array) réalisée sur deux des 11 patients appartenant à de grandes familles consanguines.

Les positions des mutations identifiées dans le gène *TRMU* pour l'ensemble des 13 patients sont résumées dans la Figure 23 :

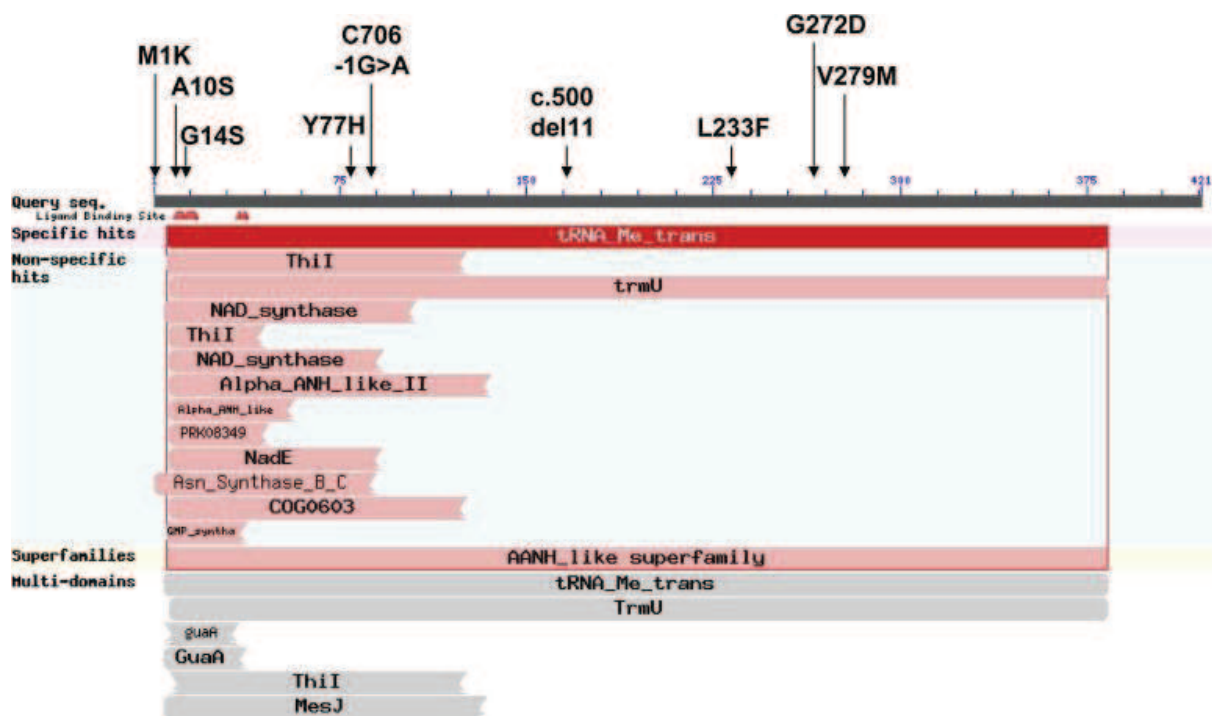


Figure 23 : Mutations identifiées dans le gène *TRMU*.

#### 4. Impact des mutations dans *TRMU* sur la traduction mitochondriale

La protéine TRMU est une méthyltransférase qui ajoute un résidu thiol au niveau de la base wobble de l'anti codon des ARNt mitochondriaux Lysine, Glycine, et Acide glutamique. Les

mutations observées dans le gène *TRMU* ont donc très probablement une conséquence au niveau de la traduction mitochondriale.

La traduction mitochondriale a été étudiée *in vitro* par marquage radioactif avec de la méthionine marquée au  $^{35}\text{S}$  dans des fibroblastes de patients. Les résultats présentés pour trois patients Israéliens (patients 2, 3 et 4) nous montrent une diminution de moitié de la quantité de protéines mitochondriales par rapport au contrôle (Figure 24).

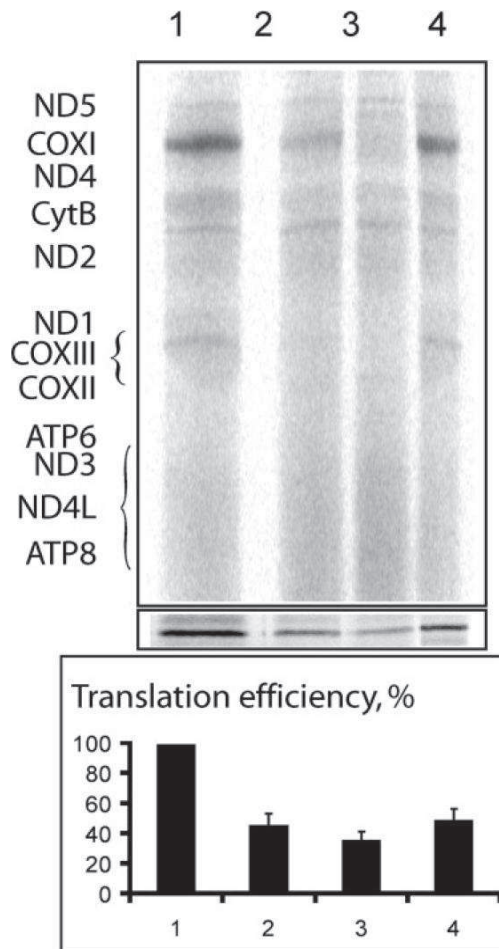


Figure 24 : Etude de la traduction mitochondriale *in vitro* par marquage à la méthionine  $^{35}\text{S}$  dans les fibroblastes des patients 2, 3 et 4 par rapport à un contrôle 1.

Cette étude a été complétée par des expériences de retard sur gel (Figure 25) ayant pour but d'étudier la thiolation à la position wobble des trois ARNt mitochondriaux ARNt-Lys, ARNt-Gln, et ARNt-Glu modifiés par l'enzyme TRMU. Lorsque les ARNt sont modifiés (thiolés) par TRMU, ils sont retardés de manière covalente par les groupements Hg contenus dans le gel de polyacrylamide et par conséquent migrent moins loin que les ARNt non thiolés. Les résultats indiquent que la quantité d'ARNt mitochondriaux Lysine, Glycine, et Glutamine thiolés est

nettement diminuée chez les patients 2, 3 et 4. Cette anomalie est bien spécifique car ces patients ont, pour un ARNt cytosolique (cyt-ARNt-Lys) contrôle modifié par une autre enzyme, un profil d'hybridation et donc une thiolation normale, comparable au contrôle.

Ceci indique que les mutations de *TRMU* ont en effet une conséquence fonctionnelle, puisqu'elles empêchent la thiolation des trois ARNt mitochondriaux ARNt-Lys, ARNt-Gln, et ARNt-Glu, expliquant l'anomalie de traduction mitochondriale.

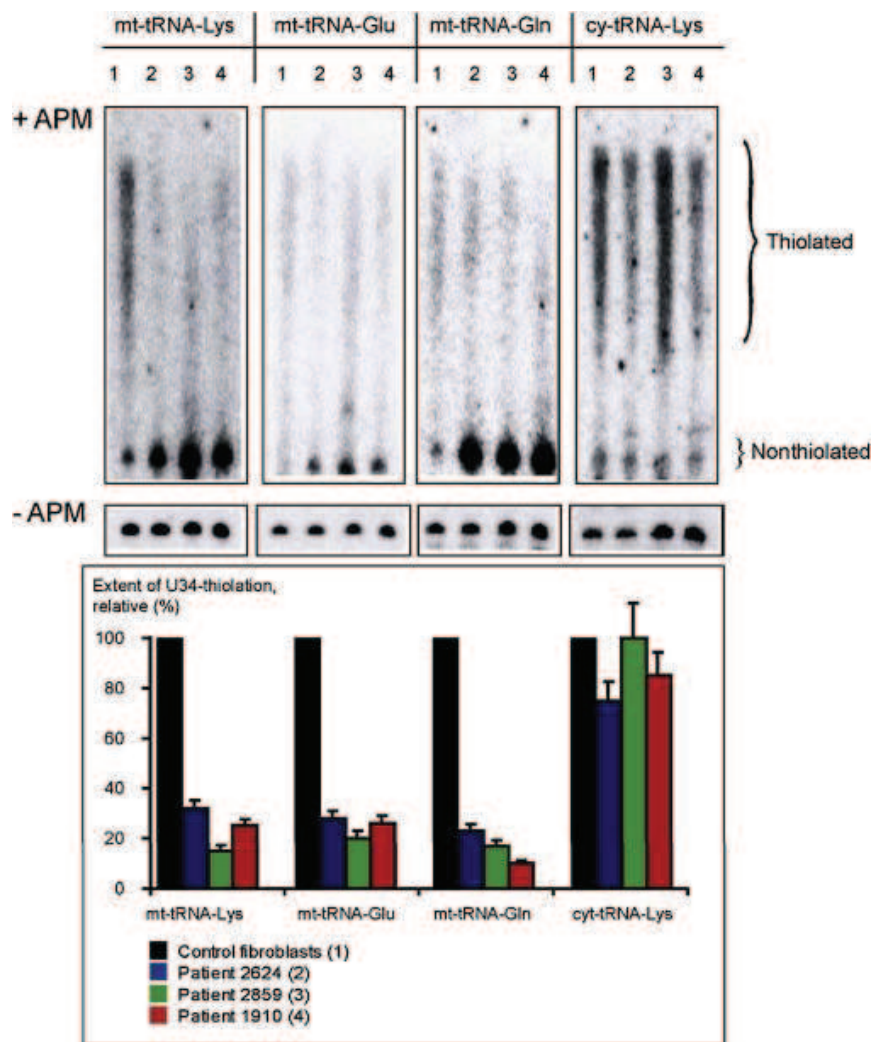


Figure 25 : Analyse de la 2-thiolation des ARNt mitochondriaux modifiés par TRMU.



## 5. Conclusion

Ce travail a permis d'identifier le gène *TRMU*, comme nouveau gène d'atteinte hépatique mitochondriale sans déplétion de l'ADNmt. Ce gène code pour une enzyme de modification des ARNt mitochondriaux permettant la thiolation des trois ARNt mitochondriaux ARNt-Lys, ARNt-Gln, et ARNt-Glu. Nous avons montré que les mutations dans le gène *TRMU* engendrent une diminution de la 2-thiolation spécifique des ARNt mitochondriaux ARNt-Lys, ARNt-Gln, et ARNt-Glu, expliquant l'anomalie de traduction mitochondriale observée chez les patients. Cette anomalie de traduction des protéines mitochondriales est responsable d'un déficit des complexes de la chaîne respiratoire contenant des protéines codées par l'ADNmt, ce que nous avons vérifié grâce à un BN-PAGE réalisé sur des fibroblastes de nos deux patients AH1 et AZ1 montrant une diminution quantitative de l'assemblage des complexes I, III, IV et V.

Les mutations identifiées dans *TRMU* sont des mutations faux-sens, d'épissage, ou de petites délétions, localisées tout le long de la séquence codante du gène. Elles ont été retrouvées chez 13 patients au total, mais uniquement chez deux patients de notre cohorte cliniquement homogène de 70 patients. Tous ont déclaré les premiers signes d'atteinte hépatique avant 6 mois. Ceci peut s'expliquer par la disponibilité limitée en cystéine pendant la période néonatale. Or la cystéine est nécessaire au fonctionnement de la protéine TRMU, puisqu'elle est le donneur de sulfure pour la réaction de 2-thiouridylation. Les patients mutés dans *TRMU* sont donc à plus haut risque durant la période néonatale. 70% des patients ne sont pas décédés lors de la phase aiguë de l'atteinte hépatique en période néonatale, ont récupéré, et n'ont pas de rechute de la maladie. L'absence de rechute des symptômes des patients ayant survécu à l'épisode aigu peut être dû à la disponibilité en cystéine plus élevée après la période néonatale.

Ce travail vient donc confirmer une fois de plus l'extrême hétérogénéité génétique des maladies mitochondriales, notamment ici celle des atteintes hépatiques mitochondriales sans déplétion de l'ADNmt. Cette hétérogénéité nous empêche d'établir des corrélations phénotype-génotype et nous limite dans notre compréhension de la physiopathologie de ces atteintes.

Ces résultats ont fait l'objet d'un article publié dans *American Journal of Human Genetics*. La publication est présentée dans les pages suivantes.

## Acute Infantile Liver Failure Due to Mutations in the *TRMU* Gene

Avraham Zeharia,<sup>1,4,9</sup> Avraham Shaag,<sup>1,9</sup> Orit Pappo,<sup>2</sup> Anne-Marie Mager-Heckel,<sup>5</sup> Ann Saada,<sup>1</sup> Marine Beinat,<sup>6</sup> Olga Karicheva,<sup>5</sup> Hanna Mandel,<sup>7</sup> Noa Ofek,<sup>3</sup> Reeval Segel,<sup>8</sup> Daphna Marom,<sup>4</sup> Agnes Rötig,<sup>6</sup> Ivan Tarassov,<sup>5</sup> and Orly Elpeleg<sup>1,\*</sup>

Acute liver failure in infancy accompanied by lactic acidemia was previously shown to result from mtDNA depletion. We report on 13 unrelated infants who presented with acute liver failure and lactic acidemia with normal mtDNA content. Four died during the acute episodes, and the survivors never had a recurrence. The longest follow-up period was 14 years. Using homozygosity mapping, we identified mutations in the *TRMU* gene, which encodes a mitochondria-specific tRNA-modifying enzyme, tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate methyltransferase. Accordingly, the 2-thiouridylation levels of the mitochondrial tRNAs were markedly reduced. Given that sulfur is a *TRMU* substrate and its availability is limited during the neonatal period, we propose that there is a window of time whereby patients with *TRMU* mutations are at increased risk of developing liver failure.

Acute liver failure in infancy is a life-threatening condition manifested by poor feeding, vomiting, jaundice, distended abdomen, hemorrhagic diathesis, irritability, and hypoactivity. Routine laboratory investigations reveal elevated liver transaminases, hypoglycemia, coagulopathy, hyperammonemia, and direct hyperbilirubinemia. The differential diagnosis includes viral infections, intoxications, and inborn errors of metabolism. The finding of hyperlactatemia directs the diagnosis toward mitochondrial respiratory chain disorders, and in about half of the patients there is a defect in the mtDNA synthesis machinery, resulting in mtDNA depletion (MIM 251880). This was heretofore attributed to mutations in three genes: *DGUOK* (MIM 601465), *POLG* (MIM 174763), and *MPV17* (MIM 137960).<sup>1–3</sup>

In the past 14 years, we have encountered eight patients in seven unrelated families of Yemenite Jewish origin, who presented in infancy with acute liver failure. All were born at term, had birth weights appropriate for gestational age, and had physiologic hyperbilirubinemia that resolved in a normal manner. All were reportedly healthy during the early neonatal period but were admitted at 2–4 months because of irritability, poor feeding, and vomiting. On physical examination, all were found to be well-nourished but lethargic, with pale-gray skin color, jaundiced sclerae, distended abdomen, and hepatomegaly. All of the patients required intensive care for several weeks, with supportive nutrition and blood products given as compensation for coagulopathy and active GIT bleeding. Liver transplantation was considered but was not performed in any of the patients.

Laboratory investigation disclosed acute liver failure (clinical and biochemical data presented in Table 1) with severe coagulopathy that included low factor 5 and 11 and was not corrected by vitamin K supplementation, low albumin, direct hyperbilirubinemia, metabolic acidosis, hyperlactatemia, and high alpha-fetoprotein. Blood ammonia level was normal or slightly elevated, and plasma amino acid profile was noted for high phenylalanine, tyrosine, methionine, glutamine, and alanine. Urinary organic acid analysis revealed massive excretion of lactate, phenylalanine and tyrosine metabolites, and ketotic dicarboxylic and 3-hydroxydicarboxylic aciduria. Serology for hepatitis viruses and body fluid cultures failed to detect an infectious etiology. Abdominal ultrasound disclosed enlarged homogenous liver with normal diameter of the bile ducts and the portal vein.

Clinical and biochemical improvement started after 2–3 weeks, and liver functions returned to normal within 3–4 months. Nonetheless, liver size had normalized only after 3 months to 3 years. Seven patients survived the acute episode, were observed on a long term follow-up (the oldest currently 14 years of age) to be developing normally, and never experienced a similar episode. One patient (2859) died of intractable lactic acidosis and multiple organ failure. During the acute phase, there was usually no indication of extrahepatic involvement, as evidenced by normal electrolytes, creatinine and renal function, blood count, bone marrow aspiration, creatine phosphokinase (CPK), electromyography (EMG), echocardiogram, ophthalmologic examination, brain magnetic resonance imaging (MRI), electroencephalogram (EEG), and nerve

<sup>1</sup>Department of Human Genetics and Metabolic Diseases, <sup>2</sup>Department of Pathology, <sup>3</sup>Department of Neonatology, Hadassah, the Hebrew University Medical Center, Jerusalem, Israel; <sup>4</sup>Day Hospitalization Unit and Department of Pediatrics A, Schneider Children's Medical Center and Sackler School of Medicine, Tel Aviv University, Israel; <sup>5</sup>UMR 7156 Centre National de la Recherche Scientifique - Université de Strasbourg, Genetique Moleculaire, Genomique, Microbiologie, Strasbourg, France; <sup>6</sup>INSERM U781 and Department of Genetics, Hôpital Necker-Enfants Malades, Université René Descartes Paris V, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France; <sup>7</sup>Metabolic Disease Unit, Rambam and the Rappaport Faculty of Medicine, Technion, Haifa, Israel; <sup>8</sup>Institute of Medical Genetics, Shaare-Zedek Medical Center, Jerusalem, Israel

<sup>9</sup>These authors contributed equally to this work

\*Correspondence: elpeleg@cc.huji.ac.il

DOI 10.1016/j.ajhg.2009.08.004. ©2009 by The American Society of Human Genetics. All rights reserved.

**Table 1. Clinical and Biochemical Data of the Patients**

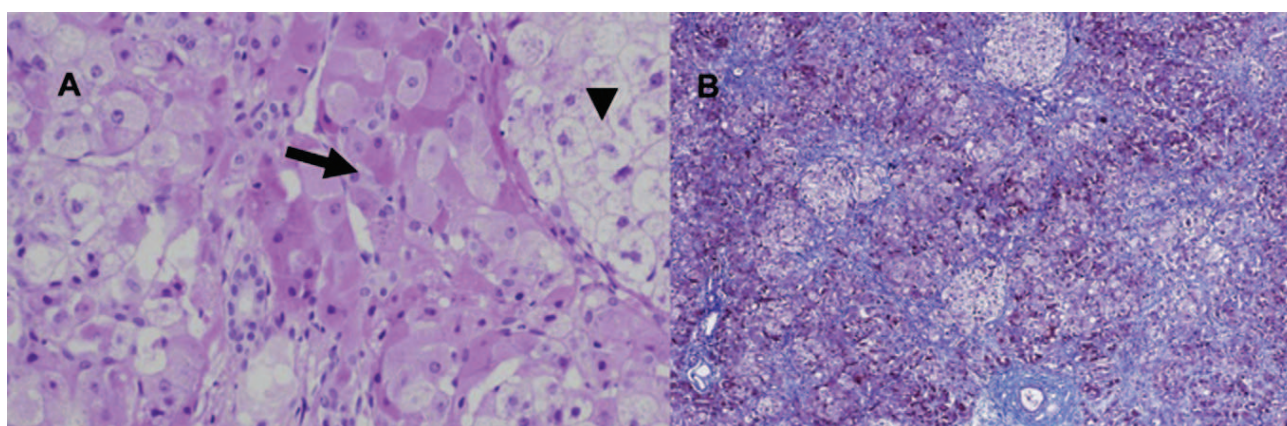
Patient	Origin	Age at Presentation	Outcome	Peak Values				
				ALT (IU/L)	GGT (IU/L)	INR	T-Bil (mg%)	Lactate (mM)
2624	Y-J	6 mo	A&W at 2 yrs	367	356	2.6	3.3	5.5
3032	Y-J	4 mo	A&W at 9 mo	169	621		5.7	4.5
1432	Y-J	2 mo	A&W at 10 yrs	1150		3.4	10	20
1116	Y-J	3 mo	A&W at 10 yrs	293	139		9.7	6.6
111	Y-J	4 mo	A&W at 8 yrs	417		3.0		7.0
421	Y-J	4 mo	A&W at 14 yrs	430		3.0	4.3	20
2859	Y-J	3 mo	death at 4 mo	400	157	7.0	24.0	30
2375	Y-J	6 mo	A&W at 2 yrs	532	305	3.6	7.5	3.2
2006	Arab	1 mo	death at 2 mo	1193	77	3.4	14.4	19
3015	Arab	6 mo	A&W at 2 yrs					
1910	Ashk.	1 day	A&W at 5 yrs	1146	270	2.3	0.1	20
Akh	Alger	1 day	death at 3 mo	93			13.2	7.0
Aza	Alger	2 days	death at 4 mo	229			6.3	10.0
control				<52	<142	<1.0	<0.4	<2

Abbreviations are as follows: ALT, alanine aminotransferase; GGT, gamma glutamyl transpeptidase; T-Bil, total bilirubin; INR, international normalized ratio; Y-J, Yemenite Jewish; Ashk, Ashkenazi-Jewish; Alger, Algerian; A&W, alive and well.

conduction velocity (NCV). An exception was patient 1116, who suffered from dilated cardiomyopathy with impaired myocardial contractility and from nephromegaly with massive proteinuria that resolved only after several months.

During the acute phase, liver biopsy, performed in two patients, revealed minimal chronic inflammation and mild focal proliferation of bile ductules with variable portal and sinusoidal fibrosis. In the parenchyma, extensive oncocyctic change in the hepatocytes was noted, as well as focal macrovesicular steatosis and focal ballooning of

their cytoplasm (Figure 1A). Iron stain revealed slight accumulation of pigment, primarily within the hepatocytes. In the liver sample of patient 3015, obtained when the patient was 9 months of age, during which time the patient was still symptomatic, the liver architecture was markedly disrupted by micronodule formation separated by delicate fibrous septae. The nodules were composed of enlarged hepatocytes, with thickening of the liver plates and hepatocanicular cholestasis (Figure 1B). The pathological and histochemical examinations of muscle tissue obtained from three patients were invariably normal.

**Figure 1. Histopathological Findings in Liver Tissue**

(A) Liver tissue showing marked oncocyctic change in the hepatocytes (arrow) and focal ballooning degeneration of hepatocytes (arrowhead) (H&E).

(B) Hepatic tissue with markedly disrupted architecture characterized by nodule formation with prominent sinusoidal fibrosis (Masson Trichrome stain).

**Table 2. Mitochondrial Enzymatic Activities, mtDNA Content, and TRMU Genotype of the Patients**

Patient	Tissue	Citrate Synthase	Complex I	Complex II	Complex II+III	Complex IV	mtDNA Content	TRMU Genotype
2624	L	270%	29%	66%	43%	15%		Y77H/Y77H
	M	21%	71%	95%	76%	47%		
3032	L	238%	7%	51%	8%	22%	143%	Y77H/Y77H
1432	L	211%		75%	34%	10%	78%	Y77H/ <sup>a</sup>
	M	38%		132%	108%	86%		
1116	L*	65%		260%	141%	103%		Y77H/Y77H
	M	64%		75%	63%	60%		
111	N.A.							Y77H/Y77H
421	N.A.							Y77H/Y77H
2859	L	208%	11%	65%	12%	16%	380%	Y77H/c.706-1G>A <sup>b</sup>
2375	N.A.							L233F/A10S
2006	L	148%	25%	70%	17%		250%	V279M/c.500-510del
3015	L	302%	8%	80%	39%	14%	104%	G272D/G272D
1910	M	75%	42%	97%	89%	29%	107%	G14S/ <sup>c</sup>
Akh	M		12%		44%	17%		M1K/M1K
Aza	M	68%	14%		47%	22%	38%	M1K/M1K

Tissue samples (L, liver; M, muscle) were obtained during the acute phase, with the exception of patient 1116, whose liver (L\*) was obtained 6 mo after the acute episode. N.A. denotes not available. All enzymatic activities are given as a percentage of the control mean and are normalized for citrate synthase activity. The citrate synthase activity and mtDNA content are given as a percentage of the control mean.

<sup>a</sup> A second mutation was not identified in the 11 exons of the *TRMU* gene, and cDNA of this patient was not available.

<sup>b</sup> This mutation resulted in exon 3 skipping (107 bp).

<sup>c</sup> The patient was heterozygous for the G14S mutation, but the patient's cDNA consisted of only the paternal allele carrying this mutation.

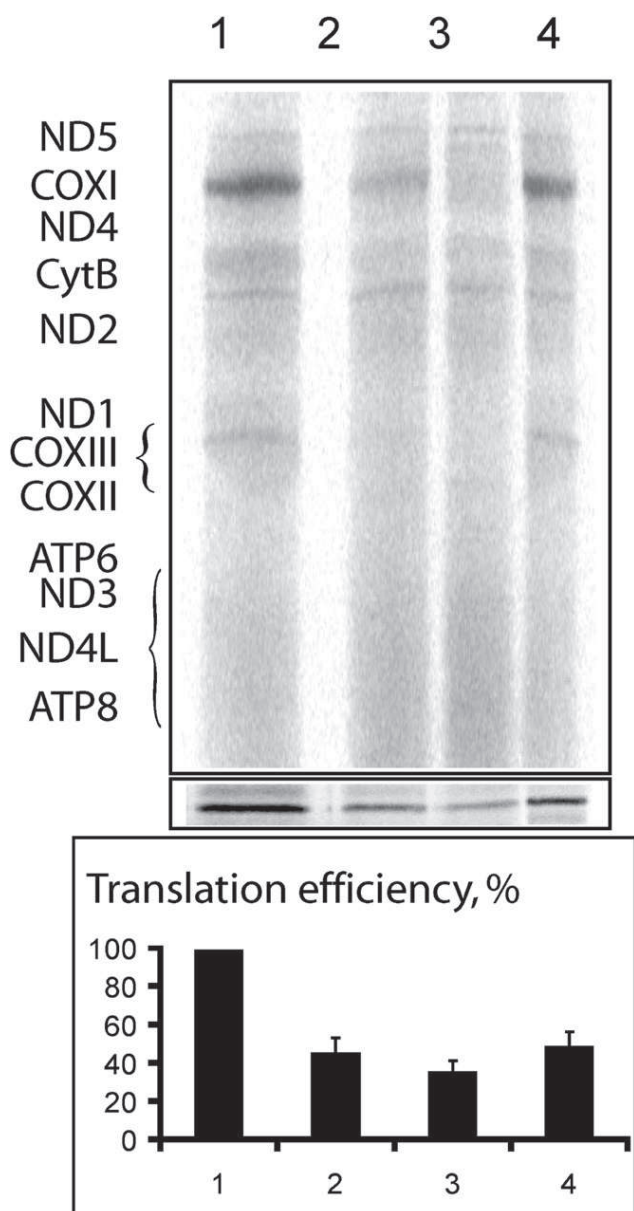
The enzymatic activities of the mitochondrial respiratory chain complexes I–IV in liver homogenate and in mitochondria isolated from the patients' muscles were determined by standard spectrophotometric methods.<sup>4</sup> In liver obtained during the acute phase, the activities of complexes I, III, and IV normalized to citrate synthase activity were markedly reduced; only complex II activity was relatively preserved (Table 2). The mitochondrial respiratory chain activities were normal in homogenate of the liver tissue obtained six months after the onset of the acute episode in patient 1116. In mitochondria isolated from the acute phase muscle tissue, only complex IV activity was slightly reduced.

The markedly reduced activities of complexes I, III, and IV in liver homogenate and the relatively normal activity of complex II—the only complex that is encoded solely by the nuclear genome—suggested a defect in the synthesis of the mtDNA-encoded proteins. The normal ratio of mtDNA to nuclear DNA in the patients' liver, as determined by real-time PCR (Table 2), ruled out mtDNA depletion. The mtDNA transcription was investigated in patient 2859 fibroblasts by determination of the abundance of the 12S and 16S rRNA transcripts and of the COX2 mRNA. The normal results of these analyses (data not shown) not only indicated intact transcription but have also excluded a defect in the mitochondrial ribosomal assembly, which would lead to a severe reduction of the

rRNA transcripts.<sup>5</sup> Assuming a defect in mitochondrial translation, we determined the sequence of the 22 mitochondrial *tRNA* genes and the two *rRNA* genes in patient 2859 liver but did not identify any mutation, suggesting a defect in a nuclear-encoded mitochondrial translation factor. We next quantified mitochondrial translation by pulse-chase incorporation of <sup>35</sup>S-methionine into mitochondrially synthesized polypeptides in fibroblasts of three patients, in the presence of 0.5 mg/ml of emetine for inhibition of cytoplasmic translation, as previously described.<sup>6</sup> To assure correct quantification, we performed immunoblotting of tubulin in the same samples. In all three patients' fibroblasts, the overall mitochondrial translation level was reproducibly twice lower than that in control cells (Figure 2).

In order to localize the mutated gene, we performed homozygosity mapping with the DNA of patients 3032 and 2624, using the GeneChip Human Mapping 250K Nsp Array of Affymetrix, as previously described.<sup>8</sup> All experiments involving DNA of the patients, their relatives, healthy controls, and patients' cells were approved by the Hadassah Ethical Review Committee. This analysis disclosed two nonoverlapping homozygous regions > 5 Mb in each sample. The only genomic region of identical homozygous markers was a 3.06 Mb region on chromosome 22, from 43.49 Mb to 46.55 Mb, which included 223 SNP markers (from rs5765930 to rs7292036). Within this





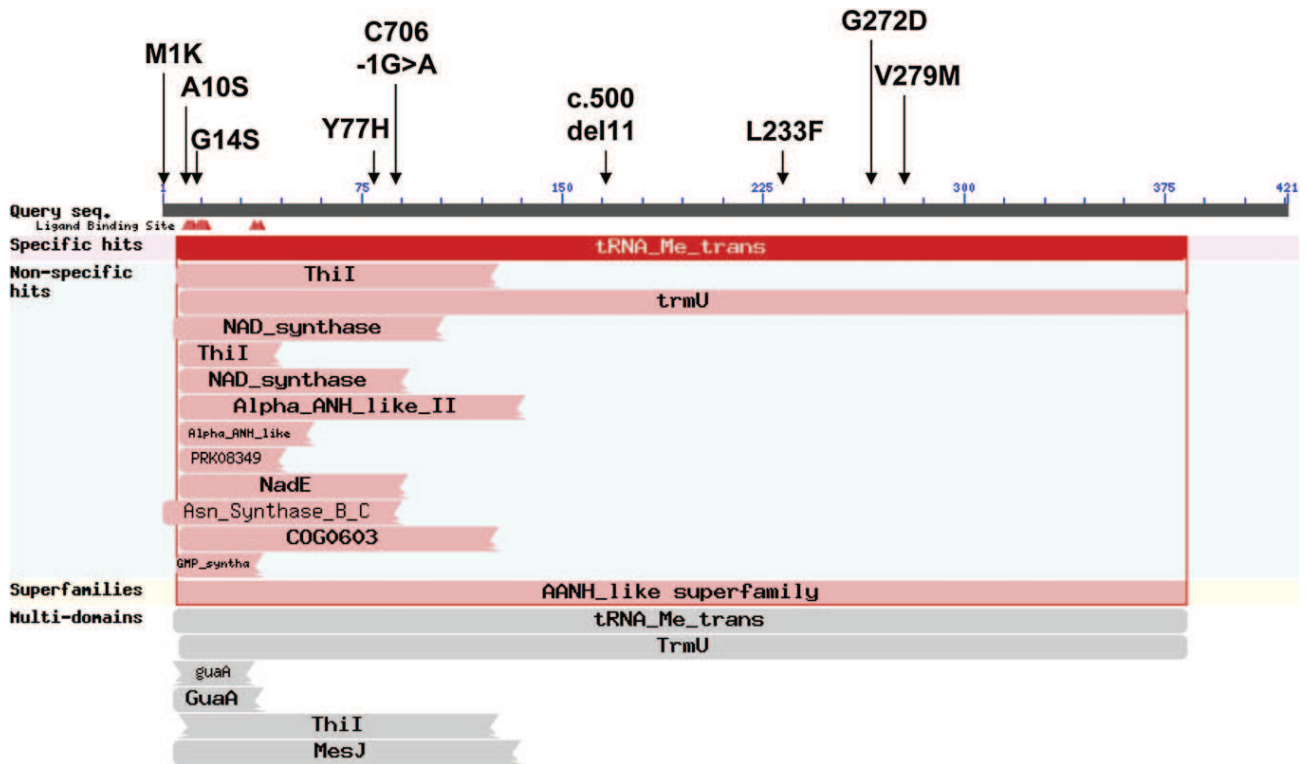
**Figure 2. Analysis of Mitochondrial Translation in the Patients' Fibroblasts**

The mitochondrial translation products on SDS-PAGE are indicated according to a standard pattern.<sup>7</sup> Assays were performed in the fibroblasts of a control (lane 1) and three patients (lanes 2–4 for patients 2624, 2859, and 1910, respectively). The relative values were normalized to tubulin (panel below the autoradiographs) and are presented as a diagram. Error bars represent the results of two independent experiments.

region, there were 27 open reading frames, including *TRMU* (MIM 610230), which encodes the mitochondria-specific tRNA-modifying enzyme, tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate methyltransferase. Sequence determination of the 11 exons of *TRMU* and their flanking intronic regions identified a homozygous mutation, c.232T>C, which changes the highly conserved Tyr77 to His (Y77H). Five patients were homozygous for the mutation and two were heterozygous. Because the mutation created an *Msp*I

restriction site, we used this enzyme for the screening of 120 anonymous individuals of Yemenite Jewish origin and identified three carriers. Patient 2859, who was heterozygous for the Y77H mutation on the maternal allele, carried a second mutation, c.706-1G>A, on her paternal allele, which resulted in skipping of exon 3. The only Yemenite Jewish patient who did not carry the Y77H mutation, patient 2375, was compound heterozygous for c.697C>T (L233F) and c.28G>T (A10S), both changing highly conserved residues. Because the patient cDNA and parental DNA were not available, we could not assign the phase of the mutations. We then screened the *TRMU* gene for mutations in DNA of patients of non-Yemenite-Jewish origin who presented with infantile liver failure and a similar pattern of respiratory chain defects and identified five additional mutations in five unrelated patients (Table 1 and Table 2). Four mutations, c.2T>A (M1K), c.40G>A (G14S), c.835G>A (V279M), and c.815G>A (G272D), changed highly conserved residues, and the fifth, c.500-510del, was a frame-shift mutation. Patient 1910 carried the G14S mutation on his paternal allele, but homozygosity for this mutation was present in cDNA produced from his fibroblasts, suggesting a nonexpressing maternal allele. No mutation was detected in the promoter region and at the ~1100 nucleotide, which separates *TRMU* from the neighboring 5' gene. The M1K mutation was identified in two Algerian patients, the G14S mutation was found in an Ashkenazi Jewish patient, and the rest of the mutations were detected in patients of Arabic ethnicity. We did not detect any carrier for the M1K mutation among 106 individuals of North African origin. Altogether, we identified nine mutations in 13 patients who presented with acute liver failure during infancy (Figure 3). Of note, no mutations were detected in the *TRMU* gene of 17 unrelated patients of North African, Jewish, and Arabic origin having a similar pattern of enzymatic defects and presenting with isolated mitochondrial liver disease immediately after birth, nor in three patients with chronic extrahepatic involvement, indicating that mutations in the *TRMU* gene primarily affect the liver at a specific window of time.

The human *TRMU* gene encodes 421-aa-long protein that participates in the modification of mitochondrial tRNAs and is therefore important for mitochondrial translation. Specifically, it is responsible for the 2-thiolation of the wobble position of the mitochondrial tRNA-Lys, tRNA-Gln, and tRNA-Glu. We therefore studied the 2-thiouridylation at the wobble nucleotide of these three tRNAs in patients 2624, 2859, and 1910. This was tested by retardation in an electrophoretic system consisting of a 10% PAAG with 7 M urea, tris-borate buffer polymerized in the presence of 50 µg/ml of (N-)Acrylamino-phenyl-mercuric chloride (APM), which was synthesized by the procedure described by Igloi.<sup>9</sup> Total cellular RNA was isolated with Trizol-reagent (Invitrogen). RNA hybridization was performed as described by Shigi et al.,<sup>10</sup> with the following [32P]-5'-end-labeled oligonucleotide probes: mt-tRNA-Lys, GGTTCCTTAATCTTTAAC; mt-tRNA-Glu, CCACGACCA



**Figure 3. The Mutations Identified in the *TRMU* Gene**

The mutations identified in the *TRMU* gene of patients with acute liver failure, depicted on a schematic representation of the conserved domains (NCBI conserved domains website). G14 is one of six residues (red arrowheads) that form the P loop motif (SGGXDS), which is an ATP-binding motif commonly found in enzymes responsible for RNA modifications.<sup>14</sup>

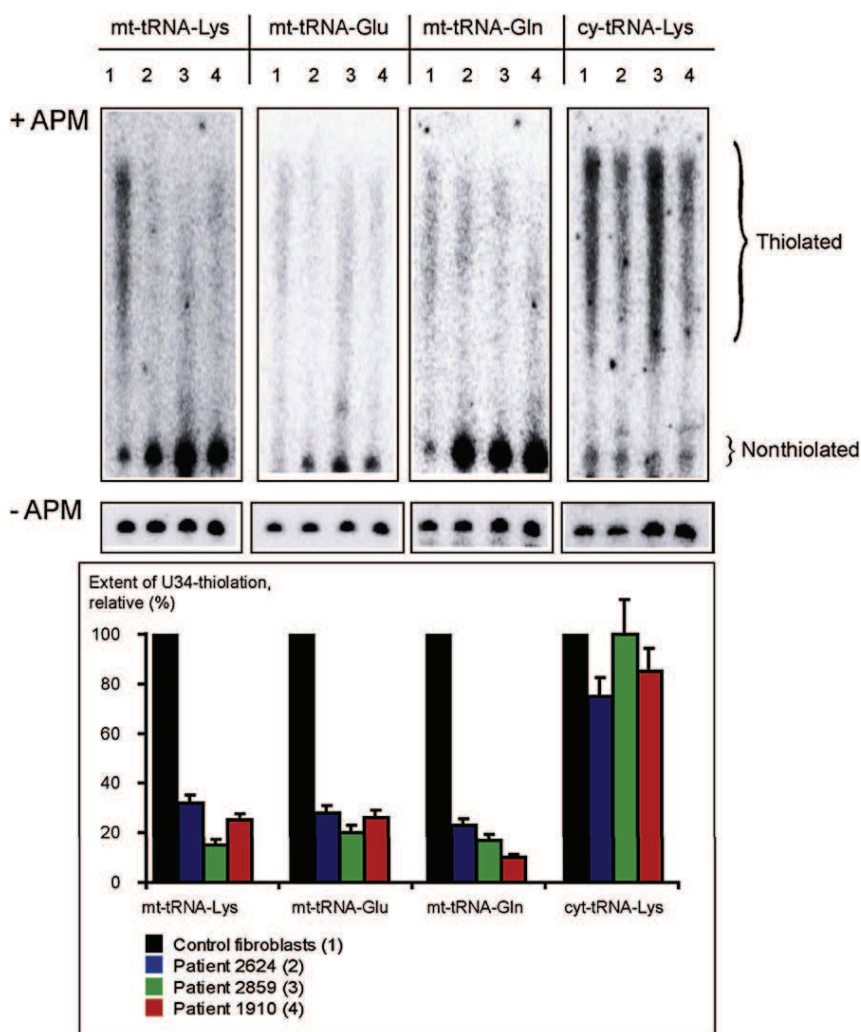
ATGATATG; mt-tRNA-Gln, CGAACCCATCCCTGAG, and cy-tRNA-Lys, ACTTGAACCCTGGACC. In this system, the thiolated tRNAs are covalently retained by Hg-groups incorporated in the polyacrylamide gel and have lower mobility than nonthiolated ones. For the purpose of quantification, hybridizations were performed in parallel after separation of the same samples on gels without APM. The results of this analysis clearly disclosed that the amount of the thio-modified mitochondrial tRNAs is severely reduced in all three patients, whereas the pattern of hybridization obtained for the cytosolic tRNA (cy-tRNA-Lys) modified by another enzyme was similar in control and patient cells (Figure 4). Finally, the pattern of hybridization obtained for the mitochondrial tRNA-Leu, which is not subjected to thio-modification, was similar in control and patient cells (data not shown).

To study the effect of the hypomodification on tRNA stability, we performed RNA hybridization of total RNA extracted from the patients' fibroblasts. This analysis disclosed slightly lower levels of several tRNAs, which was nonspecific for the thio-modified tRNAs (Figure 5). We therefore conclude that the *TRMU* mutations did not affect either the transcription level or the stability of the hypomodified tRNAs to a significant extent.

In view of these findings, we propose that the mitochondrial translation defect in our patients is the result of reduced modification of several mitochondrial tRNAs. In

*E. coli*, the 2-thiouridylation stabilizes the codon-anticodon interaction and confers the tRNA an efficient ribosome binding.<sup>11,12</sup> Until now, only one mutation in the human *TRMU* gene, A10S, had been reported. Homozygosity for this mutation had aggravated the deafness phenotype of patients who harbored the homoplasmic A1555G mutation in the mitochondrial gene encoding the 12S rRNA, *MTRNR1* (MIM 561000). The combination of *TRMU* and *MTRNR1* mutations was associated with reduced 2-thiouridylation and low content of the mitochondrial tRNAs, which led to impaired mitochondrial protein synthesis.<sup>13</sup>

The *TRMU* protein requires sulfur for its activity; cysteine desulfurase, which transfers sulfur from cysteine to the *TRMU* ortholog, has been shown to be essential for the thio-modification of bacterial tRNAs.<sup>14</sup> The availability of cysteine in the neonatal period is limited because its endogenous synthesis from methionine by the transsulfuration pathway is markedly attenuated. The activity of the rate-limiting enzyme in the pathway, cystathionase, is very low at birth and increases slowly during the first few months of life.<sup>15</sup> For this reason, cysteine is considered a conditionally essential amino acid, at least in preterm infants. Furthermore, metallothionein, a source of cysteine, is at its peak at birth and declines rapidly during the first month of life.<sup>16</sup> We propose that there is a window of time, during 1–4 months of age, whereby patients with *TRMU* mutations are at an increased risk of developing liver



#### Figure 4. Thio-Modification in Mitochondrial tRNAs

Analysis of thio-modification at position 2 of the wobble uridine via RNA hybridization of mitochondrial (mt-tRNA-Lys, mt-tRNA-Glu, and mt-tRNA-Gln) and cytoplasmic (cy-tRNA-Lys) tRNAs separated in APM-containing gels (+APM, upper panel). For quantification, the same amount of RNA obtained from patient and control fibroblasts was separated in gels without APM (-APM, middle panel). The retarded diffused zones correspond to the thiolated and nonthiolated versions of each tRNA (Thiolated and Nonthiolated, respectively). The hybridization probes and the numbers of the RNA samples are indicated at the top of the autoradiographs; the numbers correspond to the samples described under the diagram at the bottom. The quantification of the modification is presented at the bottom panel and is expressed as a percentage of the thiolated signal from the thiolated + nonthiolated signals (as presented in the -APM gel at the middle panel), normalized against the control fibroblasts. The deviations are indicated as a result of two to three independent measures (for the control fibroblasts, the deviation was quasi null and is therefore not indicated).

failure. Dietary- and metallothionein-derived cysteine may provide some protection during the first month of life, and the rising activity of cystathionase serves a similar purpose after 3–4 months of age. Nonetheless, an intercurrent illness combined with reduced dietary (cysteine) intake at 1–4 months of age may further compromise TRMU activity in these patients. This may account for the timing of the clinical presentation, mostly at 2–4 months of age, and the lack of recurrence in patients who survive the neonatal episode. Sequence determination of the *TRMU* gene is warranted in patients with acute liver failure in the first year of life, predominantly when the onset is at 1–4 months of age.

#### Acknowledgments

We are grateful to the patients and their families, to Mrs. Noa Cohen and Mrs. Corinne Belaiche for their dedicated assistance, to Prof. Shoshy Altuvia for fruitful discussions, to Prof. Michael Wilschanski for sharing of patient 1116 data, and to Dr. Israel Lerer and Prof. Elon Pras for provision of anonymous control samples. This work was supported in part by funding from the Joint Research Fund of the Hebrew University and Hadassah Medical Organization to N.O.; the Israel Science Foundation (1354-2005) to A.S and O.E; the Israeli Ministry of Health and

Association Française contre les Myopathies to A.S, I.T., and O.K.; and the Fondation pour la Recherche Médicale and Agence Nationale de la Recherche Scientifique to I.T. and A.M.M.H.

Received: June 10, 2009

Revised: August 4, 2009

Accepted: August 6, 2009

Published online: September 3, 2009

#### Web Resources

The URLs for data presented herein are as follows:

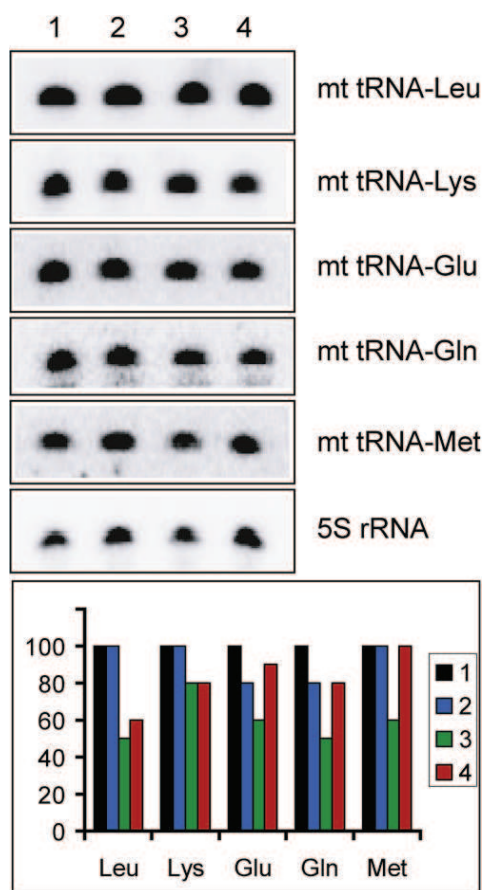
NCBI Conserved Domains, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=cdd>

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/>

#### References

- Mandel, H., Szargel, R., Labay, V., Elpeleg, O., Saada, A., Shalata, A., Anbinder, Y., Berkowitz, D., Hartman, C., Barak, M., et al. (2001). The deoxyguanosine kinase gene is mutated in





**Figure 5. Quantification of Mitochondrial tRNAs by RNA Hybridization**

RNA was isolated from the fibroblasts of a control (1) and three patients (2–4 for patients 2624, 2859, and 1910, respectively). Relative values normalized to the 5S rRNA signal are presented in the diagram below the autoradiographs (the various tRNAs are indicated on the x axis only by their respective amino acid abbreviation; thus, Leu stands for mitochondrial tRNA-Leu transcript). Average values of two to three independent experiments are presented. The error was never higher than 10%.

individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA. *Nat. Genet.* 29, 337–341.

- Naviaux, R.K., and Nguyen, K.V. (2004). POLG mutations associated with Alpers' syndrome and mitochondrial DNA depletion. *Ann. Neurol.* 55, 706–712.
- Spinazzola, A., Viscomi, C., Fernandez-Vizarrá, E., Carrara, F., D'Adamo, P., Calvo, S., Marsano, R.M., Donnini, C., Weiher, H., Strisciuglio, P., et al. (2006). MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion. *Nat. Genet.* 38, 570–575.
- Saada, A., Shaag, A., and Elpeleg, O. (2003). mtDNA depletion myopathy: elucidation of the tissue specificity in the mito-

chondrial thymidine kinase (TK2) deficiency. *Mol. Genet. Metab.* 79, 1–5.

- Miller, C., Saada, A., Shaul, N., Shabtai, N., Ben-Shalom, E., Shaag, A., Hershkovitz, E., and Elpeleg, O. (2004). Defective mitochondrial translation due to a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Ann. Neurol.* 56, 734–738.
- 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). 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.
- Enriquez, J.A., Cabezas-Herrera, J., Bayona-Bafaluy, M.P., and Attardi, G. (2000). Very rare complementation between mitochondria carrying different mitochondrial DNA mutations points to intrinsic genetic autonomy of the organelles in cultured human cells. *J. Biol. Chem.* 275, 11207–11215.
- Edvardson, S., Shaag, S., Kolesnikova, O., Gomori, J.M., Tarassov, I., Einbinder, T., Saada, A., and Elpeleg, O. (2007). Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-tRNA synthetase gene is associated with ponto-cerebellar hypoplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 81, 857–862.
- Igloi, G.L. (1988). Interaction of tRNAs and of phosphorothioate-substituted nucleic acids with an organomercurial. Probing the chemical environment of thiolated residues by affinity electrophoresis. *Biochemistry* 27, 3842–3849.
- Shigi, N., Suzuki, T., Tamakoshi, M., Oshima, T., and Watanabe, K. (2002). Conserved bases in the TΨC loop of tRNA are determinants for thermophile-specific 2-thiouridylation at position 54. *J. Biol. Chem.* 277, 39128–39133.
- Ashraf, S.S., Sochacka, E., Cain, R., Guenther, R., Malkiewicz, A., and Agris, P.F. (1999). Single atom modification (O→S) of tRNA confers ribosome binding. *RNA* 5, 188–194.
- Yarian, C., Marszalek, M., Sochacka, E., Malkiewicz, A., Guenther, R., Miskiewicz, A., and Agris, P.F. (2000). Modified nucleoside dependent Watson-Crick and wobble codon binding by tRNA<sup>Lys</sup>UUU species. *Biochemistry* 39, 13390–13395.
- Guan, M.X., Yan, Q., Li, X., Bykhovskaya, Y., Gallo-Teran, J., Hajek, P., Umeda, N., Zhao, H., Garrido, G., Mengesha, E., et al. (2006). Mutation in TRMU related to transfer RNA modification modulates the phenotypic expression of the deafness-associated mitochondrial 12S ribosomal RNA mutations. *Am. J. Hum. Genet.* 79, 291–302.
- Umeda, N., Suzuki, T., Yukawa, M., Ohya, Y., Shindo, H., Watanabe, K., and Suzuki, T. (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, 1613–1624.
- Zlotkin, S.H., and Anderson, G.H. (1982). The development of cystathionase activity during the first year of life. *Pediatr. Res.* 16, 65–68.
- Zlotkin, S.H., and Cherian, M.G. (1988). Hepatic metallothionein as a source of zinc and cysteine during the first year of life. *Pediatr. Res.* 24, 326–329.





## II. *TRMU*, *GFM1*, *TSFM* ET *LARS* NE SONT PAS DES GENES MAJEURS D'ATTEINTE HEPATIQUE MITOCHONDRIALE SANS DEPLETION DE L'ADN<sub>MT</sub>

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, *TRMU* n'est pas un gène majeur d'atteinte hépatique mitochondriale sans déplétion de l'ADN<sub>mt</sub> puisque nous l'avons exclu par séquençage Sanger dans une première série de 36 patients.

Des mutations responsables d'atteintes hépatiques mitochondriales sans déplétion de l'ADN<sub>mt</sub> ont été progressivement mises en évidence, avant et pendant mon travail de thèse, dans plusieurs autres gènes impliqués dans la traduction des protéines codées par l'ADN<sub>mt</sub>. Il s'agit de *GFM1* (Coenen, Antonicka et al. 2004; Antonicka, Sasarman et al. 2006; Galmiche, Serre et al. 2012), *TSFM* (Vedrenne, Galmiche et al. 2012) codant pour les facteurs G1 et S de la traduction mitochondriale. Enfin, une mutation de *LARS* codant la leucyl-ARNt synthétase cytosolique a été mise en évidence dans une grande famille consanguine d'hépatopathie mimant une maladie mitochondriale (Casey, McGettigan et al. 2012).

Afin de définir l'incidence des mutations dans les gènes *TRMU*, *GFM1*, *TSFM* et *LARS*, nous avons réalisé une étude systématique de ces gènes pour une cohorte de 40 patients ayant une atteinte hépatique et sans déplétion de l'ADN<sub>mt</sub>. De plus, comme la quantification de l'ADN<sub>mt</sub> n'a pas pu être réalisée pour tous les patients, nous avons également analysé les gènes de déplétion *DGUOK*, *POLG*, *MPV17* et *PEO1*. Nous avons pour cela combiné le séquençage haut débit exome, réalisé pour 35 de ces patients, le séquençage Sanger, ainsi que la cartographie génétique pour les familles multiplex et/ou consanguines.

### 1. Patients

Les 40 patients, 4 à 7, 10-11, 16 à 33, 35 à 45 et 48 à 52, présentent une atteinte hépatique mitochondriale isolée ou syndromique. Pour la plupart d'entre eux, les premiers signes de la maladie impliquent la fonction hépatique. 17/40 patients présentent une atteinte hépatique isolée associée ou non à une hypotonie. Les autres patients présentent une atteinte hépatique syndromique avec des atteintes cardiaques, digestives, oculaires ou hématologiques. On notera que le retard de croissance est un signe relativement commun puisque présent chez 11/40 patients. Les patients 18, 20, 24, 27, 30, 36 et 44 ont pu bénéficier d'une transplantation

hépatique, mais seulement trois d'entre eux sont toujours en vie. La mesure de l'activité de la chaîne respiratoire dans l'homogénat de foie et les fibroblastes montre un déficit multiple pour la plupart des patients (25/40), ou encore un déficit isolé du complexe I (5/40), III (1/40) ou IV (8/40). Pour certains patients, la quantification de l'ADNmt dans le foie a pu être réalisée et était normale (>50% par rapport aux valeurs contrôles).

## 2. Etude des gènes candidats

Nous avons réalisé une cartographie génétique par SNP pour les patients 48 à 52 nés de parents consanguins, pour les patients 6-7 ainsi que leurs parents et sœurs saines, et pour les patients 16-17 et leurs parents consanguins.

Pour plusieurs patients, le séquençage Sanger a été fait pour les gènes *POLG* et *DGUOK* en diagnostic de routine, ainsi que pour les autres gènes quand nécessaire.

Le séquençage exome a été réalisé pour les patients 4 à 7, 10-11, 16 à 33 et 35 à 45. Toutes les séquences obtenues par séquençage exome ont été analysées indépendamment pour chaque patient. Nous avons examiné systématiquement chaque variation. Les SNP ayant une fréquence supérieure à 1% ont été considérés comme des polymorphismes. La pathogénicité des SNP rares (fréquence <1%) provoquant un changement d'acide aminé ainsi que l'impact potentiel des SNP synonymes sur l'épissage a été déterminé grâce au logiciel Alamut.

Comme nous l'avons énoncé, la quantification de l'ADNmt dans le foie était normale pour certains patients, mais n'a cependant pas pu être réalisée pour tous les patients car les biopsies de foie n'étaient pas toutes disponibles. Nous avons donc étudié systématiquement les gènes connus pour causer une déplétion de l'ADNmt, *DGUOK*, *POLG*, *MPV17* et *PEO1*.

### a. Gènes associés à une atteinte hépatique avec déplétion de l'ADNmt

#### i. *DGUOK*

Les patients 6 et 7, nés de parents non-consanguins, ne partagent pas de génotypes communs au locus *DGUOK*. De plus, les SNP en amont et en aval du locus *DGUOK* ont un *lod-score* inférieur à -2 permettant d'exclure ce gène comme le gène causal de la maladie. Le patient 16 est hétérozygote pour le SNP rs4853153 situé à 1 Mb après *DGUOK* et tous les autres SNP autour de ce gène ont des *lod-score* négatifs. Enfin, des *lod-score* inférieurs à -2 ont été obtenus pour

plusieurs SNP au locus *DGUOK* pour les patients 48 à 52. Ces résultats nous permettent donc d'exclure *DGUOK* comme le gène responsable de la maladie chez ces patients.

Pour les patients 4, 5, 20 à 22, 26, 11, 33, 36, 40 et 43, le séquençage Sanger des régions codantes de *DGUOK* n'a pas permis de mettre en évidence de mutation.

L'exome a révélé deux mutations hétérozygotes pour le patient 35. Une duplication de 4 paires de bases dans l'exon 6 c.762\_765dup provoquant la substitution de l'acide aminé Phénylalanine 256 par un codon STOP (p.F256X) et une transition faux-sens dans l'exon 5 c.656T>C provoquant la substitution protéique p.L219P. Ces mutations ont été confirmées par séquençage Sanger. Deux variations homozygotes c.677A>G and c.563G>T identifiées par séquençage exome respectivement chez les patients 11 et 38 mais non confirmées en séquençage Sanger ont été considérées comme des artéfacts. Le séquençage exome de *DGUOK* a révélé des séquences normales pour les autres patients.

#### ii. *POLG*

La cartographie par SNP nous a permis d'exclure le gène *POLG* chez les patients 6-7, 50 et 51. Les patients 16-17, 48 et 52 sont toutefois homozygotes pour plusieurs SNP au locus *POLG*. Nous avons donc séquencé par séquençage Sanger les 23 exons de *POLG* et n'avons mis en évidence aucune mutation. De plus, un SNP hétérozygote (rs2307438) identifié dans l'exon 22 pour le patient 36 a confirmé que *POLG* n'est pas le gène de la maladie pour ce patient. L'exon 2, premier exon codant de *POLG*, n'est pas couvert par le séquençage exome pour les patients 22, 24, 25, 28, 29, 30, 32, 33, 35, 37 et 39. Le séquençage Sanger de l'exon 2 a révélé une séquence génomique normale pour tous ces patients. Les exons du gène *POLG* sont normaux à la fois par séquençage Sanger et séquençage exome pour le reste des patients.

#### iii. *MPV17*

Les SNP localisés respectivement à 1,9 et 2,7 Mb en amont et en aval du locus *MPV17* sont non informatifs pour les patients 6-7 et leur famille, nous empêchant d'exclure ce gène. Les séquençages Sanger et exome de ces patients n'ont montré aucune mutation pathogène. Des SNP hétérozygotes localisés autour du locus *MPV17* et/ou des *lod-score* inférieurs à -2 ont été observés pour les patients 16-17, 48 à 50 et 52 nous permettant d'exclure ce gène comme le gène causal. Une analyse *lod-score* pour le patient 39 a montré que les SNP rs896019 et rs718153, localisés 4,6 et 2,7 Mb en amont et en aval du locus *MPV17*, ont un *lod-score* inférieur

à -2. Ceci a permis de définir une région de 7 Mb dans laquelle les SNP ont des *lod-score* négatifs (-0,12 à -0,93), ce qui suggère fortement que *MPV17* n'est pas le gène de la maladie. Le séquençage exome de *MPV17* a révélé des séquences normales pour les autres patients.

*iv. PEO1*

Le génotypage par SNP a permis d'exclure le gène *PEO1* pour les patients 6-7, 16-17, 36 et 48 à 52. Plusieurs SNP consécutifs sont hétérozygotes pour les patients nés de parents consanguins parents et les enfants atteints nés de parents non-consanguins ont des génotypes différents. De plus, le *lod-score* de la plupart des SNP au locus *PEO1* est inférieur à -2. L'analyse des séquences codantes du gène *PEO1* par séquençage exome ou Sanger n'a pas permis d'identifier de mutation pathogène.

**b. Gènes associés à une atteinte hépatique sans déplétion de l'ADNmt**

*i. GFM1*

Un *lod-score* inférieur à -2 a été identifié pour la plupart des SNP entourant le locus *GFM1* pour les patients 6-7, 16-17 et 48 à 52 nous permettant d'exclure définitivement ce gène en tant que gène causal de la maladie. Pour les autres patients, les exons 2 à 18 ont une séquence normale d'après le séquençage exome. Cependant, l'exon 1 de *GFM1* riche en GC est très peu couvert par le séquençage exome. Le séquençage Sanger de cet exon n'a pas permis de détecter de mutation pour l'ensemble des patients.

*ii. LARS*

Le gène *LARS* a pu être exclu par génotypage par SNP pour les patients 6-7, 16-17 et 48 à 52, soit parce que leurs *lod-score* était inférieurs -2 ou parce que plusieurs SNP entourant le gène étaient hétérozygotes pour les patients nés de parents consanguins ou haplodifférents pour les frères et sœurs nés de parents non-consanguins. Le séquençage exome a montré des séquences normales pour les patients restants.

*iii. TSFM*

Le gène *TSFM* a été exclu par génotypage par SNP pour les patients 6-7, 16-17 et 48 à 52. A la fois le séquençage exome et Sanger ont révélé une séquence normale du gène *TSFM* pour les autres patients.

*iv. TRMU*

Des SNP hétérozygotes 1 Mb en amont et en aval du locus *TRMU* ainsi que des *lod-score* inférieurs à -2 nous ont permis d'exclure ce gène comme le gène causal pour les patients 16-17 et 48 à 52. Les *lod-score* compris entre -1,3 et 0,9 pour les SNP entourant *TRMU* ne permettent pas d'exclure définitivement *TRMU* pour les patients 6-7 mais le séquençage exome nous a permis de détecter plusieurs SNP génodifférents chez ces sœurs atteintes au locus *TRMU*. Le séquençage exome et le séquençage Sanger réalisé pour les autres patients n'a pas mis en évidence de mutation.

### 3. Conclusion

Cette étude nous a permis, par cartographie génétique, séquençage exome et séquençage Sanger, d'exclure pour 39 des 40 patients les gènes *DGUOK*, *POLG*, *MPV17*, *PEO1*, *TRMU*, *GFM1*, *TSMF* et *LARS* connus pour causer une atteinte hépatique mitochondriale.

Le génotypage par SNP et l'analyse de *lod-score* ont été réalisés pour 5 patients (48 à 52) ainsi que pour leurs familles pour les patients 16 à 18 et 6-7. La petite taille des familles étudiées par cartographie génétique n'a pas permis d'obtenir de *lod-score* significatif permettant de localiser le gène responsable de la maladie. Cependant, nous avons souvent observé un *lod-score* inférieur à -2 pour plusieurs SNP entourant les gènes candidats, ce qui permettait de les exclure définitivement comme gène causal de la maladie. Ceci démontre donc la puissance de la cartographie génétique, même si celle-ci est faite seulement pour un enfant atteint né de parents consanguins.

Le séquençage exome représente également une approche puissante pour identifier de nouveaux gènes responsable de maladies mitochondriales. Nos résultats montrent qu'il peut aussi être utilisé en diagnostic. Nous avons réalisé le séquençage exome pour 35 de nos patients et avons identifié des variations dans le gène *DGUOK* pour trois patients non apparentés. Toutefois, seulement les mutations obtenues pour le patient 35 ont été confirmées par séquençage Sanger. Les autres variations étaient donc des faux négatifs, d'où l'importance d'une vérification systématique des résultats de l'exome en séquençage Sanger. A l'inverse, le séquençage exome génère aussi des faux négatifs, notamment concernant les régions riches en GC qui sont très mal couvertes. Comme les exons 1 sont souvent très riches en GC, ces derniers sont souvent omis par le séquençage exome. En effet, sur les huit gènes étudiés, l'exon 1 de *GFM1*, de *TRMU* et l'exon 2 de *POLG* sont riches en séquences GC et n'étaient donc pas couvertes par le séquençage exome pour un grand nombre de patients. Le séquençage exome de ces exons n'a toutefois pas mis en évidence de mutations.

Concernant le patient 35 présentant des mutations dans le gène *DGUOK*, aucune biopsie de foie n'était disponible pour quantifier l'ADNmt dans ce tissu. Ceci montre l'intérêt de la quantification de l'ADNmt dans le foie, qui constitue une aide primordiale pour le diagnostic génétique.

La plupart des mutations rapportées dans les gènes *DGUOK*, *POLG*, *MPV17*, *PEO1*, *GFM1*, *LARS*, *TSMF* et *TRMU* sont des mutations ponctuelles, ayant pour conséquence un changement d'acide

aminé ou des modifications d'épissage. Des grandes délétions ou une disomie uniparentale ont cependant été rarement décrites (Lee, Dimmock et al., 2009 ; Haudry, de Lonlay et al., 2012). Comme le séquençage exome ne permet pas de détecter de grandes délétions ou réarrangements, nous ne pouvons pas exclure la présence de ce type de mutations dans ces gènes exclus par séquençage exome.

En conclusion, cette étude montre que les gènes *GFM1*, *LARS*, *TSFM* et *TRMU* ne sont pas des gènes majeurs d'atteinte hépatique sans déplétion de l'ADNmt et confirme l'hétérogénéité génétique des atteintes hépatiques d'origine mitochondriale.



### III. CARTOGRAPHIE GENETIQUE DANS DEUX FAMILLES D'ATTEINTE HEPATIQUE MITOCHONDRIALE SANS DEPLETION DE L'ADN<sub>MT</sub>

Notre cohorte de 70 patients d'atteinte hépatique mitochondriale sans déplétion de l'ADN<sub>mt</sub> est composée de 14 patients de familles multiplex consanguines, 10 de familles multiplex non consanguines et 46 cas sporadiques. L'analyse de la cartographie génétique sur les familles multiplex et consanguines AH et AK a permis d'identifier des mutations dans le gène *TRMU* pour ces deux familles. Comme nous venons de le voir dans le chapitre précédent, les autres patients ne sont pas mutés dans *TRMU*, ni dans *GFM1*, *TSFM* ou *LARS*, ce qui démontre l'hétérogénéité clinique de la cohorte.

Afin d'identifier de nouveaux gènes responsables d'atteinte hépatique mitochondriale, nous avons choisi d'étudier deux familles pour lesquelles nous avons réalisé une cartographie génétique. Il s'agit de la famille multiplex consanguine KE et la famille multiplex non consanguine CO.

#### 1. Famille KE

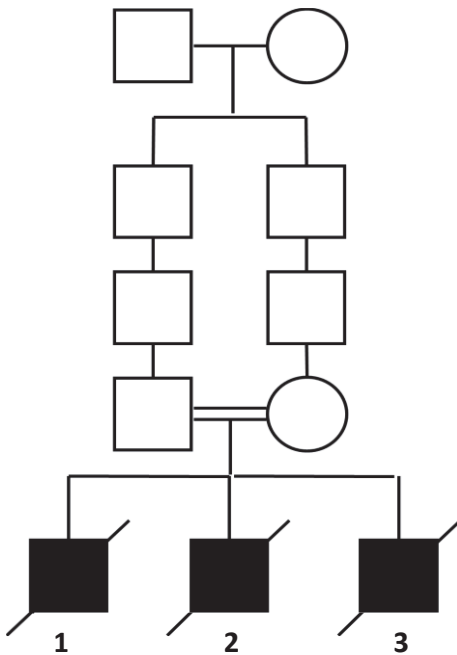


Figure 26 : Arbre généalogique de la famille KE

La famille KE, multiplex et consanguine (coefficient de consanguinité 1/64), comporte 3 garçons décédés de la même maladie à savoir une insuffisance hépatique et une acidose lactique (Figure 26).

Le patient KE1 (patient 16 du Tableau 4) a déclaré une insuffisance hépatique à 1 jour de vie. L'examen neurologique montre une hypotonie. Le patient présente des anomalies digestives ainsi qu'une anémie. La mesure de l'activité de la chaîne respiratoire pour ce patient a révélé un déficit des complexes I, III, IV et V sur l'homogénat de foie, et une chaîne respiratoire normale dans les fibroblastes. Le bilan biologique montre une hyperlactacidémie (5,8 mM, normale inférieure à 2,2 mM), une augmentation des ALAT (135 UI/L, normale entre 5 et 30) et des ASAT (45 UI/L, normale entre 10 et 40 UI/L), et des  $\gamma$ GT (40 UI/L, normale entre 5 et 20). Le patient KE1 est décédé à 1 mois.

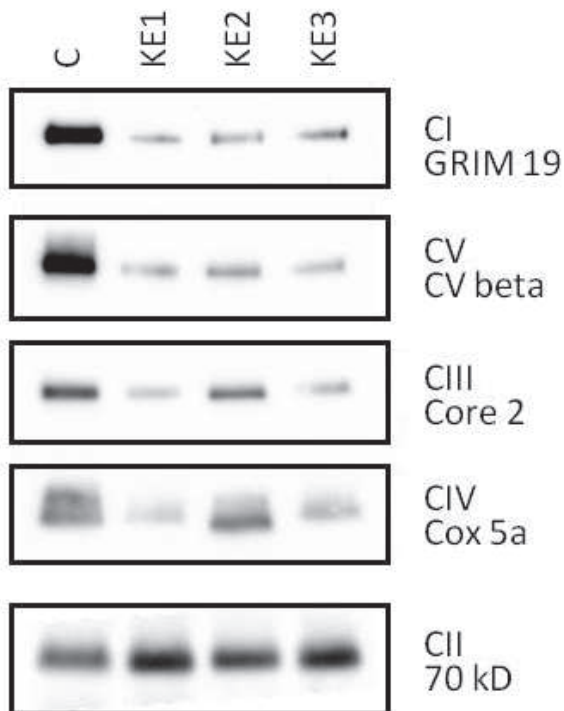
La présentation clinique des patients KE2 et KE3 est similaire à celle de KE1.

Le patient KE2 (patient 17 du Tableau 4) a un déficit des complexes I et IV dans les mitochondries de foie, le patient KE3 (patient 18 du Tableau 4) un déficit des complexes I et IV dans le muscle et un déficit du complexe I dans le foie.

Le garçon KE3 est décédé à 2 mois après une transplantation hépatique.

Les 3 patients n'ont pas de déplétion de l'ADNmt dans le foie.

Nous avons étudié l'assemblage de la chaîne respiratoire par BN-PAGE sur les mitoplastes extraits des fibroblastes des patients KE1, KE2 et KE3 (Figure 27). Le BN-PAGE révèle une diminution importante de la quantité des complexes I, III, IV et V assemblés par rapport au contrôle.



**Figure 27 :** BN-PAGE réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes des patients de la famille KE et d'un contrôle.

*Les quantités des complexes I, III, IV et V sont diminuées chez les individus atteints KE1, KE2 et KE3 par rapport au contrôle (C).*

Pour cette famille, une cartographie génétique a été réalisée au moyen de marqueurs SNPs. Un premier génotypage (GeneChip Human Mapping 10 K 2.0 Xba Array) a été réalisé sur les deux parents et les enfants KE1 et KE2 avant la naissance de KE3, qui a mis en évidence plusieurs régions d'homozygotie présentées dans le Tableau 8. Ces régions ont un *lod-score* ne permettant pas de les exclure, et le *lod-score* le plus élevé est trouvé pour la région du chromosome 15 : 58,145,779-70,038,045. Cependant, ce *lod-score* est inférieur à 3, ce qui ne permet pas d'affirmer que cette région est liée à la maladie.

Localisation des régions d'homozygotie	Taille des régions	Nombre de gènes	<i>Lod-score</i>
chr1:25,276,120-29,551,611	4,3 Mb	58	-1,5
chr2:52,952,660-57,159,179	4,2 Mb	16	0,9
chr2:125,212,769-134,136,656	8,9 Mb	33	1,2
chr3:1,478,225-3,999,316	2,5 Mb	4	0
chr3:56,888,944-59,239,607	2,3 Mb	15	-1,5
chr5:172,949,443-179,796,676	6,8 Mb	77	0,7
chr6:131,665,647-137,367,332	5,7 Mb	35	-0,5

<b>chr9:37,877,654-45,720,196</b>	7,8 Mb	14	0,3
<b>chr9:121,463,780-124,487,428</b>	3 Mb	12	-1,5
<b>chr10:38,082,051-44,719,344</b>	6,6 Mb	9	-1,4
<b>chr11:44,506,152-48,203,162</b>	3,7 Mb	36	-0,8
<b>chr11:114,491,260-119,818,206</b>	5,3 Mb	49	-1
<b>chr12:17,230,095-20,341,109</b>	3,1 Mb	7	-0,3
<b>chr15:58,145,779-70,038,045</b>	11,9 Mb	73	1,9
<b>chr15:87,870,376-91,670,854</b>	3,8 Mb	26	-1,5

**Tableau 8 : Régions d'homozygotie pour la famille KE obtenues grâce au génotypage 10K réalisé sur les enfants atteints KE1 et KE2 et les parents.**

Ce génotypage a été suivi d'un deuxième génotypage (Human Mapping 250K Nspl array) pour le patient KE3. Les SNP étant différents sur ces deux puces, il a été impossible de réaliser un calcul de *lod-score* pour l'ensemble de la famille. Le second génotypage sur le troisième garçon atteint a été très informatif puisqu'il a permis d'exclure 11 des 15 régions d'homozygotie considérées comme candidates après le premier génotypage et de réduire la taille de 3 des 4 régions restantes (Tableau 9).

<b>Localisation des régions d'homozygotie</b>	<b>Taille des régions</b>	<b>Nombre de gènes</b>
<b>chr2:55,125,469-56,002,979</b>	0,9 Mb	10
<b>chr3:2,673,291-3,592,016</b>	0,9 Mb	4
<b>chr5:175,398,143-178,586,200</b>	3,2 Mb	61
<b>chr15:58,145,779-70,038,045</b>	11,9 Mb	73

**Tableau 9 : Régions d'homozygotie pour la famille KE obtenues en couplant le génotypage 10K (sans KE3) et le génotypage 250K réalisé sur l'enfant KE3.**

Nous avons au final pour cette famille deux régions d'homozygoties candidates principales, l'une sur le chromosome 5, l'autre sur le chromosome 15, ainsi que deux petites régions d'homozygotie sur les chromosomes 2 et 3. Cependant, il y a peu de chance que le gène de la maladie soit dans une de ces deux dernières régions. En effet, la consanguinité de la famille (coefficient de consanguinité 1/64) n'est pas très lointaine. Cela implique que le nombre de recombinaisons méiotiques n'a pas été très important et donc que la ou les régions d'homozygotie partagées entre les trois enfants atteints sont assez grandes. Il est donc très peu probable qu'une région d'homozygotie de 1 Mb représente le locus de la maladie.

Les quatre régions d'homozygotie comportent 148 gènes au total. Les gènes *TRMU*, *GFM1*, *TSFM* et *LARS* connus à ce jour pour causer des atteintes hépatiques mitochondriales sans déplétion de l'ADNmt ne sont pas localisés dans ces régions d'homozygotie et sont donc exclus.

Nous avons donc par la suite sélectionné des gènes candidats au sein de ces régions à savoir les gènes codant pour des protéines mitochondriales, ou pour des protéines prédites pour avoir une localisation mitochondriale (quelle que soit leur fonction). Nous avons également sélectionné les gènes ayant des orthologues chez la levure *S. cerevisiae* dont les mutations conduisent à un phénotype respiratoire.

Afin de prédire la localisation mitochondriale, nous avons utilisé différentes bases de données ou programmes de prédiction (Predotar, TargetP, MitoPred, Mitoprot, Mitocarta). Nous regardons préférentiellement les protéines mitochondriales ou prédites comme telles, cependant ce critère n'est pas exclusif, car comme nous l'avons vu certaines maladies mitochondriales sont dues à des mutations dans des gènes codant pour une protéine cytoplasmique, comme par exemple *LARS* ou *p53R2*.

Nous avons commencé par sélectionner les meilleurs candidats, à savoir 4 gènes codant pour des protéines mitochondriales ou prédites pour aller dans la mitochondrie, tous localisés dans la région d'homozygotie du chromosome 15.

Le gène *NOX5* (NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5), code une NADPH oxydase à domaine ferriréductase de fonction inconnue. Le gène orthologue de levure, *FRE6*, code une ferriréductase putative et sa délétion conduit à une accumulation du fer, ce qui pourrait être compatible avec la surcharge ferrique observée chez le patient.

Le séquençage sur ADN génomique a révélé des SNPs hétérozygotes chez les enfants atteints. Le gène *NOX5* est donc exclu puisque nous travaillons sous l'hypothèse d'une mutation homozygote. Ce gène étant situé à l'extrémité de la région d'homozygotie, cela a de plus permis de réduire légèrement la taille de la région candidate, qui compte désormais 6,6 Mb.

Deux autres gènes candidats impliqués dans la traduction mitochondriale : *MTFMT* (mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase), enzyme permettant la formylation du ARNt<sup>Met</sup>, et *LACTB* codant une protéine ribosomale mitochondriale MRPL56, ont également été exclus par séquençage.

Le dernier gène codant pour une protéine mitochondriale, *CLPX* (caseinolytic protease X homolog), a également été séquencé et ne présente pas de mutation.

Pour compléter et affiner cette analyse de nouveaux gènes candidats par leur fonction, nous avons combiné cette étude à d'autres données telles que l'analyse du transcriptome et le séquençage haut débit exome. Le transcriptome a été fait pour le garçon atteint KE2 et le séquençage exome pour les trois patients. Nous reviendrons plus en détail sur le séquençage exome dans le chapitre suivant.

L'analyse transcriptomique a été réalisée sur les ARN de fibroblastes, et le taux de transcrit de chaque gène chez le malade est rapporté à celui d'une série de 5 contrôles. Pour sélectionner un déficit d'expression du gène, nous avons fixé comme seuil un rapport d'expression patient/contrôle inférieur ou égal à 0,5. Nous avons analysé les taux d'expression des gènes localisés dans les régions d'homozygotie. Un gène localisé dans la région d'homozygotie du chromosome 5, *NOP16* (nucleolar protein 16) codant pour une protéine dont la transcription est régulée par c-Myc, et un gène localisé dans la région d'homozygotie du chromosome 15, *KIAA0101* (de fonction inconnue) sont sous-exprimés de manière significative, avec des rapports respectifs de 0,41 et 0,21 par rapport aux contrôles. Le séquençage de *NOP16* et de *KIAA0101* n'a pas permis de mettre en évidence de mutations.

Nous avons également séquencé pour la famille KE des gènes sous-exprimés chez un ou plusieurs autres patients de la cohorte, dans une démarche de séquençage systématique des individus de la cohorte. En effet la sous-expression d'un gène chez un individu peut être le reflet d'une mutation provoquant une déstabilisation de l'ARNm, ce qui nous permet en premier lieu d'identifier le gène candidat. Ensuite, nous séquençons celui-ci chez tous les patients, y compris ceux pour qui ce gène est exprimé normalement par rapport aux contrôles, car une mutation faux-sens n'aboutit pas forcément à une diminution de l'expression du gène. Nous avons séquencé les gènes *NFS1* (cysteine desulfurase, mitochondrial), *TRIT1* (tRNA isopentenyltransferase 1, mitochondrial), *TRNT1* (tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1) et *GTPBP3* (GTP binding protein 3). Ces gènes soit ne sont pas sous exprimés pour l'individu KE2, soit les sondes ne donnent pas de résultats significatifs concernant ces gènes. Ces quatre gènes ont été exclus par séquençage Sanger.

L'analyse du séquençage haut débit exome s'effectue selon les critères de tri suivants : on recherche une mutation homozygote non répertoriée dans les bases de SNP, commune aux 3 enfants atteints, et située dans les régions d'homozygotie.

Avec ces critères, l'analyse exome a mis en évidence une variation homozygote c.2653 -5G>A localisée dans le gène *DDX41* (Probable ATP-dependent RNA helicase DDX41 DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41). Cette variation est située 5 nucléotides avant l'exon 12. Elle a été confirmée par séquençage Sanger sur l'ADN génomique ainsi que sur l'ADNc pour voir si elle aurait une conséquence sur l'épissage. Le séquençage effectué sur l'ADNc obtenu à partir d'ARN de fibroblastes et d'une biopsie de foie n'a montré aucune anomalie du transcrit. Cette variation n'a donc aucune conséquence et le gène *DDX41* a été exclu.

Nous avons dans une deuxième approche utilisé les données du séquençage exome, à savoir l'ensemble des nombreuses variations mises en évidence par ce séquençage, que nous avons comparées avec les SNP obtenus par le génotypage 250K. Le but est de sélectionner de nouvelles régions candidates qui auraient pu être omises dans l'analyse des résultats du génotypage, à cause de la plus faible densité des marqueurs du génotypage 250K comparée à celle de l'exome. Nous avons donc sélectionné des régions où la densité des marqueurs du génotypage 250K est très faible et regardé dans ces régions les variations de l'exome afin de constituer les haplotypes des enfants. Nous avons par cette méthode sélectionné 13 nouvelles régions d'homozygotie candidates (Tableau 10).

Localisation des régions d'homozygotie	Taille des régions	Nombre de gènes
chr2:186,310,000-190,772,000	4,5 Mb	19
chr3:88,104,000-98,289,000	10,2 Mb	24
chr4:6,273,000-11,520,000	5,2 Mb	32
chr5:45,757,000-52,042,000	6,3 Mb	3
chr8:40,607,000-48,188,000	7,6 Mb	27
chr8:130,591,000-134,241,000	3,6 Mb	18
chr9:45,517,000-66,971,000	21,5 Mb	3
chr9:100,862,000-102,953,000	2,1 Mb	13
chr9:125,537,000-130,760,000	5,2 Mb	48
chr11:68,215,000-70,926,000	2,7 Mb	15
chr15:80,361,934-82,142,863	1,8 Mb	39
chr17:71,675,354-74,409,070	2,7 Mb	43
chr22:44,419,443-47,830,859	3,4 Mb	21

Tableau 10 : Nouvelles régions d'homozygotie obtenues grâce aux données de l'exome pour la famille KE.

Parmi ces régions, nous recherchons des gènes candidats selon les critères cités précédemment. Aucun gène candidat ne présente de variations non répertoriées dans les banques de SNP d'après l'analyse de l'exome, mais nous avons cependant sélectionné 3 gènes qui présentent une couverture ou une profondeur insuffisante en exome. Il s'agit d'*ACOX3* (acyl-CoA oxidase 3, pristanoyl), *PTRH1* (peptidyl-tRNA hydrolase 1 homolog (*S. cerevisiae*)) et *OSGEPL1* (O-sialoglycoprotein endopeptidase-like 1). Tous ont été exclus par séquençage Sanger.

Dans la famille KE, les enfants atteints sont tous des garçons. Nous considérons alors l'hypothèse d'une maladie dont la transmission serait liée à l'X. Sous cette hypothèse, nous regardons la ségrégation des marqueurs entre la mère et les garçons atteints. Après l'analyse du génotypage 250K, la quasi totalité du chromosome X est une région d'haploidentité. Nous avons donc réalisé en complément un génotypage à l'aide de marqueurs microsatellites répartis sur l'ensemble du chromosome X. Les marqueurs microsatellites sont très polymorphes et donc beaucoup plus informatifs que les SNP, ce qui permet de réduire la taille des régions candidates. Dans ces régions candidates, 16 gènes codent pour des protéines ayant une localisation mitochondriale. Ni le séquençage Sanger effectué en premier lieu sur les meilleurs gènes candidats : *TRMT2B* (tRNA methyltransferase 2 homolog B (*S. cerevisiae*)) et *CA5B* (carbonic anhydrase VB), ni l'analyse de l'exome n'ont permis de mettre en évidence de mutation dans ces gènes.



Gène	Localisation chromosomique	Dénomination du gène	Transcriptome	Predotar	Target P	Mitopred	Mitoprot	Mitocarta	Homologue chez la levure <i>S. cerevisiae</i>
<i>TRIT1</i>	chr1:40,306,706-40,349,177	tRNA isopentenyltransferase 1, mitochondrial	1,19	0,58	0,709	99,00%	0,9342	-	<i>MOD5</i>
<i>MTIF2</i>	chr2:55,463,756-55,494,771	Mitochondrial translational initiation factor 2	-	0,28	0,820	99,00%	0,9013	18	<i>IFM1</i>
<i>PNPT1</i>	chr2:55,861,198-55,921,011	Polyribonucleotide nucleotidyltransferase 1, mitochondrial	-	0,50	0,920	99,00%	0,3632	12	-
<i>OSGEPL1</i>	chr2:190,619,041-190,627,670	O-sialoglycoprotein endopeptidase-like 1	0,79	0,54	0,736	92,30%	0,8589	8	<i>QR17</i>
<i>TRNT1</i>	chr3:3,168,600-3,190,706	tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1	-	0,92	0,840	99,00%	0,9991	8	<i>CCA1</i>
<i>GFM1</i>	chr3:158,363,954-158,410,360	G elongation factor, mitochondrial 1	-	0,79	0,885	99,00%	0,6689	24	<i>MEF1</i>
<i>ACOX3</i>	chr4:8,368,009-8,430,208	Acyl-Coenzyme A oxidase 3, pristanoyl	0,63	0	0,123	-	0,177	6	<i>POX1</i>
<i>LARS</i>	chr5:145,492,589-145,562,294	Leucyl-tRNA synthetase	0,65	0,01	0,083	-	0,1956	2	<i>CDC60</i>
<i>NOP16</i>	chr5:175,743,556-175,748,146	NOP16 nucleolar protein homolog	0,42	0,18	0,612	84,60%	0,9977	-	<i>NOP16</i>
<i>HIGD2A</i>	chr5:175,748,390-175,749,357	HIG1 domain family, member 2A	-	0	0,109	-	0,0031	18	-
<i>PRELID1</i>	chr5:176663441-176666556	PRELI domain containing 1	0,60	0,12	0,614	99,00%	0,7414	-	<i>MGM1</i>
<i>DDX41</i>	chr5:176,871,184-176,876,523	DEAD box protein 41	-	0,50	0,096	-	0,0100	-6	-
<i>B4GALT7</i>	chr5:176,963,467-176,969,937	Beta-1,4-galactosyltransferase 7	1,18	0,30	0,813	92,30%	0,9668	-	-
<i>LOC653314</i>	chr5:177,414,996-177,415,888	Similar to ribosomal protein L19	-	0,40	0,378	92,30%	0,7047	-	-
<i>AGXT2L2</i>	chr5:177,568,196-177,585,686	Alanine-glyoxylate aminotransferase 2-like 2	-	0	0,551	92,30%	0,2288	6	<i>CAR2</i>
<i>MTO1</i>	chr6:74,189,659-74,190,528	Mitochondrial translation optimization 1	0,81	0,78	0,887	92,30%	0,5291	24	<i>MTO1</i>
<i>PTRH1</i>	chr9:130,476,227-130,487,152	Peptidyl-tRNA hydrolase 1 homolog ( <i>S. cerevisiae</i> )	0,42	0,50	0,774	99,00%	0,9923	15	-

Gène	Localisation chromosomique	Dénomination du gène	Transcriptome	Predotar	Target P	Mitopred	Mitoprot	Mitocarta	Homologue chez la levure <i>S. cerevisiae</i>
<i>T5FM</i>	chr12:58,176,528-58,196,639	Ts translation elongation factor, mitochondrial	-	0,89	0,944	99,00%	0,9838	26	-
<i>LACTB</i>	chr15:61,201,085-61,209,079	Lactamase beta	1,39	0,75	0,885	99,00%	0,9674	14	-
<i>PPIB</i>	chr15:62,235,067-62,242,407	Peptidylprolyl isomerase B.	0,21	0,21	0,048	84,60%	0,1394	-5	<i>CPR5</i>
<i>KIAA0101</i>	chr15:62,444,264-62,460,755	LOC9768	-	0,40	0,823	92,30%	0,6262	-3	-
<i>RBPMS2</i>	chr15:62,819,148-62,854,823	RNA binding protein with multiple splicing 2 (RBPMS2)	-	0	0,104	-	0,0181	-3	-
<i>MTFMT</i>	chr15:63,080,903-63,109,030	Mitochondrial methionyl-tRNA formyltransferase	-	0,88	0,894	99,00%	0,9991	11	<i>FMT1</i>
<i>CLPX</i>	chr15:63,229,837-63,264,616	ClpX caseinolytic protease X homolog ( <i>E. coli</i> ) mitochondrial	0,86	0,01	0,499	92,30%	0,9734	23	-
<i>DIS3L</i>	chr15:64,372,988-64,405,953	DIS3 mitotic control homolog	0,74	0,77	0,863	84,60%	0,7502	-	-
<i>RPL4</i>	chr15:64,578,707-64,584,238	Ribosomal protein L4	1,03	0,81	0,800	99,00%	0,0575	-7	<i>RPL4B</i>
<i>NOX5</i>	chr15:67,094,109-67,136,127	NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5	0,68	0,01	0,669	84,60%	0,6179	-	<i>FRE6</i>
<i>GLCE</i>	chr15:67,240,027-67,351,598	D-glucuronyl C5-epimerase	1,54	0,11	0,066	92,30%	0,9472	-11	-
<i>GTPBP3</i>	chr19:17,445,791-17,453,540	GTP binding protein 3 (mitochondrial)	1,08	0	0,490	-	0,0600	7	<i>MSS1</i>
<i>NFS1</i>	chr20:34,256,610-34,287,287	Cysteine desulfurase, mitochondrial	0,71	0,94	0,885	99,00%	0,9734	-	<i>NFS1</i>
<i>TRMU</i>	chr22:46,731,298-46,750,216	tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate methyltransferase	-	0	0,438	99,00%	0,5353	15	<i>SLM3</i>
<i>TRMT2B</i>	chrX:100,151,186-100,193,720	tRNA methyltransferase 2 homolog B ( <i>S. cerevisiae</i> )	-	0,59	0,737	92,30%	0,8391	18	<i>TRM2</i>
<i>CASB</i>	chrX:15,666,345-15,712,578	Carbonic anhydrase VB, mitochondrial	-	0,81	0,888	99,00%	0,9447	-	-

**Tableau 11 : Gènes séquencés et exclus pour la famille KE.**

En jaune sont indiqués les scores d'adressage mitochondrial significatifs (probabilité >0,5 et score Mitocarta >5). En vert sont indiqués les rapports d'expression patient/contrôle ≤0,5.

## 2. Famille CO

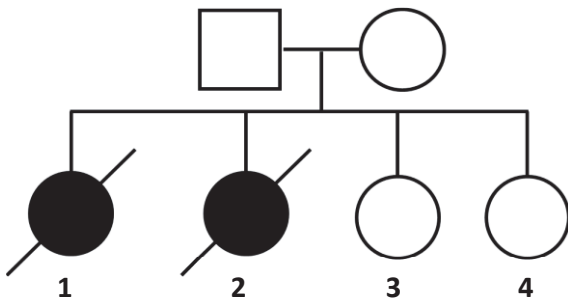


Figure 28 : Arbre généalogique de la famille CO.

La famille CO est une famille multiplex non consanguine qui comporte 4 enfants, dont 2 sœurs saines et 2 sœurs atteintes (Figure 28).

La patiente CO1 (patiente 6 de la cohorte) a déclaré un ictère néonatal à 1 mois de vie, une insuffisance hépato cellulaire, une hépatite fulminante. Le bilan biologique montre une hyperlactacidémie (5,8 mM pour une normale inférieure à 2,2 mM), avec un rapport L/P = 30 (valeur normale : 10). L'étude enzymologique de la chaîne respiratoire mitochondriale met en évidence un déficit de l'ensemble de complexes I, III, IV et V dans l'homogénat de foie. Un déficit sévère du complexe IV est noté dans le muscle mais les fibroblastes en culture ne montrent aucun déficit enzymologique. La patiente est décédée à 2 mois.

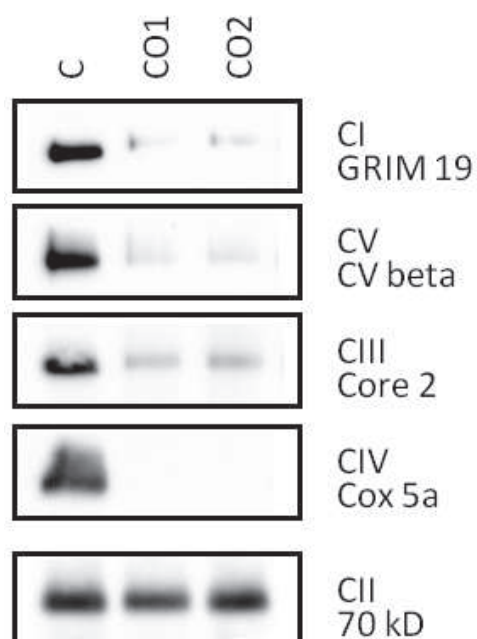
La patiente CO2 (patiente 7) a présenté le même tableau clinique que celui de sa sœur.

Les deux patientes n'ont pas d'anomalie qualitative de l'ADNmt. Aucune déplétion de l'ADNmt dans le foie n'a été mise en évidence et par acquis de conscience les gènes de déplétion *POLG*, *DGUOK* et *MPV17* ont été exclus par séquençage.

Les gènes *TRMU* et *GFM1* pour lesquels nous avons retrouvé des mutations chez 3 patients de notre cohorte d'atteinte hépatique mitochondriale sans déplétion ont également été exclus par séquençage Sanger chez les 2 patientes.

Nous avons réalisé une étude de l'assemblage de la chaîne respiratoire en BN-PAGE sur les mitoplastes extraits des fibroblastes des patientes CO1 et CO2 (Figure 29). Le BN-PAGE montre

une anomalie quantitative des complexes I, III et V sans anomalie qualitative et une absence totale de complexe IV.



**Figure 29** : BN-PAGE réalisé sur des mitochondries extraites de fibroblastes des patientes de la famille CO.

Les quantités des complexes I, III et V sont diminuées et il y a une absence de complexe V assemblé chez les patientes CO1 et CO2 par rapport au contrôle C.

Un génotypage a été réalisé sur les deux parents ainsi que les quatre enfants en utilisant des marqueurs SNPs (GeneChip Human Mapping 10K 2.0 Xba Array), permettant de mettre en évidence 14 régions d'haploidentité (Tableau 12). Le *lod-score* maximum obtenu est de 0,9 pour plusieurs régions.

Localisation des régions d'haploidentité	Taille des régions	Nombre de gènes	<i>Lod-score</i>
chr3:44,062,218-55,927,705	11,9 Mb	79	0,2
chr3:142,588,010-150,161,620	7,6 Mb	23	0,2
chr5:16,837,623-80,313,242	63,5 Mb	210	0,9
chr7:81,952,039-156,822,481	74,8 Mb	297	0,9
chr10:21,227,953-82,495,991	61,3 Mb	268	0,9
chr12:93,433-9,814,630	9,7 Mb	54	0,9
chr13:18,482,227-27,958,849	9,5 Mb	36	0,7
chr14:59,226,863-77,579,983	18,4 Mb	192	0,8
chr15:21,490,020-34,347,401	12,9 Mb	42	0,9

<b>chr17:51,454,448-70,734,710</b>	18,4 Mb	92	0,9
<b>chr18:242,309-5,949,508</b>	5,7 Mb	18	0,8
<b>chr19:15,353,598-39,376,125</b>	24 Mb	119	0,9
<b>chr20:7,254,715-42,102,052</b>	34,8 Mb	137	0,9
<b>chr20:56,025,396-61,366,604</b>	5,3 Mb	32	0,8

**Tableau 12 : Régions d'haploidentité obtenues par le génotypage 10K réalisé pour l'ensemble des individus de la famille CO.**

Du fait de la petite taille de cette famille, on obtient un nombre assez important de régions d'haploidentité et par conséquent beaucoup de gènes candidats par leur position.

Les gènes *TRMU*, *GFM1*, *TSFM* et *LARS* ne sont pas localisés dans ces régions d'haploidentité et sont donc exclus.

Afin d'orienter la sélection de gènes candidats, nous avons, comme pour la famille KE, combiné la cartographie génétique aux données du transcriptome et de l'exome réalisés pour cette famille. Le transcriptome et le séquençage exome ont été faits pour les deux sœurs CO1 et CO2.

Nous avons analysé les taux d'expression des gènes appartenant aux régions d'haploidentité candidates. Aucun gène candidat ayant un rapport d'expression patient/contrôle inférieur ou égal à 0,5 ne se trouve dans ces régions candidates.

Nous avons alors séquencé pour la famille CO des gènes qui étaient sous-exprimés chez un ou plusieurs patients de la cohorte, dans une démarche de séquençage systématique des individus de la cohorte. Nous avons séquencé les gènes *METTL9* (methyltransferase like 9), *METTL7A* (methyltransferase like 7A), *C12orf72* ou *METTL20* (methyltransferase like 20), *PIIF* (peptidylprolyl isomerase F), *TRMT5* (tRNA methyltransferase 5), *NFS1* (cysteine desulfurase, mitochondrial), *TRIT1* (tRNA isopentenyltransferase 1, mitochondrial), *TRNT1* (tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1) et *GTPBP3* (GTP binding protein 3). Seul le gène *PIIF* est sous-exprimé avec un rapport patient/contrôle=0,55 pour la patiente CO1 et il n'y a pas de résultat significatif concernant les sondes des autres gènes. Ces 9 gènes ont été exclus par séquençage Sanger.

L'analyse du séquençage haut débit exome s'effectue selon les critères de tri suivants : on recherche deux mutations hétérozygotes composites, non répertoriées dans les bases de SNP, communes aux deux filles atteintes, et situées dans les régions d'haploidentité.

Sous ces critères, aucune mutation n'a été détectée dans un gène codant pour une protéine mitochondriale ou prédite pour être mitochondriale. Cependant les deux sœurs atteintes partagent une variation hétérozygote dans un bon gène candidat, *MRPS33* (Mitochondrial ribosomal protein S33), qui de plus est localisé dans la région d'haploidentité de cette famille située sur chromosome 7. Nous retenons ce candidat, sous l'hypothèse que la deuxième mutation serait intronique et non détectée avec la couverture de l'exome. Cette variation g.140356872 T>C aboutit à la substitution faux-sens p. M11V et a été confirmée par séquençage Sanger sur l'ADN génomique ainsi que sur l'ADNc. Cependant, le séquençage de l'ADNc n'a pas révélé d'anomalie d'épissage qui aurait été le révélateur de la présence d'une deuxième mutation intronique. Comme nous avons accès aux ADN de tous les membres de la famille, nous avons donc séquencé ce gène pour tous les individus et avons retrouvé la substitution g.140356872 T>C à l'état hétérozygote (ce qui exclut la présence d'une délétion) chez les quatre sœurs ainsi que chez la mère, mais pas chez le père. Le séquençage de l'ADNc ne montre pas d'anomalie. La ségrégation de cette variation n'est pas compatible avec la maladie et donc le gène *MRPS33* est exclu.

Devant l'absence de résultat concluant, nous avons tout comme pour la famille KE réalisé un tri manuel en utilisant l'ensemble des nombreuses variations mises en évidence par ce séquençage, que nous avons comparées avec les SNP obtenus par le génotypage 10K. Le but est de réduire la taille des régions d'haploidentité et de sélectionner de nouvelles régions candidates qui auraient pu être omises dans l'analyse des résultats du génotypage. Nous avons par cette méthode réduit les régions d'haploidentité et sélectionné de nouvelles régions d'haploidentité candidates (Tableau 13).

Localisation des régions d'haploidentité	Taille des régions	Nombre de gènes
<b>chr3:44,594,918-54,927,112</b>	10,3 Mb	68
<b>chr5:16,526,682-79,653,414</b>	63,1 Mb	198
<b>chr7:82,417,039-156,822,481</b>	74,4 Mb	274
<b>chr10:25,345,953-81,900,191</b>	66,5 Mb	197
<b>chr12:439,804-9,814,630</b>	9,4 Mb	45

<b>chr13:18,482,227-27,958,849</b>	9,5 Mb	32
<b>chr14:63,924,883-69,537,983</b>	5,6 Mb	39
<b>chr17:52,320,448-70,734,710</b>	18,4 Mb	78
<b>chr19:15,353,598-39,376,125</b>	24 Mb	119
<b>chr20:10,333,915-42,813,072</b>	32,5 Mb	115
<b>chr20:57,041,319-61,366,604</b>	4,3 Mb	24

**Tableau 13 : Régions d'haploidentité pour la famille CO obtenues en couplant les données du génotypage 10K et du séquençage haut débit exome.**

Parmi ces régions, un gène de traduction, *CTU1* (cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 1) a un bon score de prédiction de localisation à la mitochondrie, même si la protéine serait d'après sa dénomination une enzyme de modification des ARNt cytosoliques. La séquence du gène n'est pas couverte par l'exome car ce dernier est localisé dans une région riche en GC, très difficilement amplifiable. L'amplification des exons du gène a été réalisée après mise au point et le séquençage Sanger n'a pas révélé de mutation pour cette famille.

Gène	Localisation chromosomique	Dénomination du gène	Transcriptome		Predotar	Target P	Mitopred	Mitoprot	Mitocarta	Homologue chez la levure <i>S. cerevisiae</i>
			Patiente 1	Patiente 2						
<i>TRIT1</i>	chr1:40,306,706-40,349,177	tRNA isopentenyltransferase 1, mitochondrial	0,91	-	0,58	0,709	99,00%	0,9342	-	<i>MOD5</i>
<i>TRNT1</i>	chr3:3,168,600-3,190,706	tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1	-	2,70	0,92	0,840	99,00%	0,9991	8	<i>CCA1</i>
<i>GFM1</i>	chr3:158,363,954-158,410,360	G elongation factor, mitochondrial 1	-	0,79	0	0,885	99,00%	0,6689	24	<i>MEF1</i>
<i>LARS</i>	chr5:145,492,589-145,562,294	Leucyl-tRNA synthetase	0,61	0,62	0,01	0,083	-	0,1956	2	<i>CDC60</i>
<i>MTO1</i>	chr6:74,189,659-74,190,528	Mitochondrial translation optimization 1	-	-	0,78	0,887	92,30%	0,5291	24	<i>MTO1</i>
<i>MRP33</i>	chr7:140,705,961-140,714,781	Mitochondrial ribosomal protein S33	-	1,44	0,03	0,806	-	0,8555	7	-
<i>PIIF</i>	chr10:81,107,220-81,115,089	Peptidylprolyl isomerase F	0,55	-	0,87	0,948	99,00%	0,8291	29	-
<i>C12orf72</i> <i>METTL20</i>	chr12:31,800,094-31,822,016	Methyltransferase like 20	1,14	0,72	0,29	0,581	84,60%	0,7478	-	-
<i>METTL7A</i>	chr12:51,318,803-51,324,574	Methyltransferase like 7A	-	-	0	0,006	-	0,8281	-7	-
<i>TSFM</i>	chr12:58,176,528-58,196,639	Ts translation elongation factor, mitochondrial	1,37	0,69	0,89	0,944	99,00%	0,9838	26	-
<i>TRMT5</i>	chr14:61,438,167-61,447,782	tRNA methyltransferase 5	0,70	-	0,30	0,570	84,60%	0,6802	1	-
<i>NOX5</i>	chr15:67,094,109-67,136,127	NADPH oxidase, EF-hand calcium binding domain 5	0,68	-	0,01	0,669	84,60%	0,6179	-	<i>FRE6</i>
<i>METTL9</i>	chr16:21,610,856-21,668,792,	Methyltransferase like 9	-	-	0,18	0,796	92,30%	0,9864	-2	-
<i>GTPBP3</i>	chr19:17,445,791-17,453,540	GTP binding protein 3 (mitochondrial)	0,97	0,77	0	0,490	84,60%	0,0600	7	<i>MSS1</i>
<i>CTU1</i>	chr19:51,600,863-51,611,647	Cytoplasmic tRNA 2-thiolation protein 1	-	-	0,05	0,740	92,30%	0,9570	-	-
<i>NFS1</i>	chr20:34,256,610-34,287,287	Cysteine desulfurase, mitochondrial	0,71	-	0,94	0,885	99,00%	0,9734	30	<i>NFS1</i>
<i>TRMU</i>	chr22:46,731,298-46,750,216	tRNA 5-methylaminomethyl-2-thiouridylate methyltransferase	-	-	0	0,438	99,00%	0,5353	15	<i>SLM3</i>

**Tableau 14 : Gènes séquencés et exclus pour la famille CO.**

En jaune sont indiqués les scores d'adressage mitochondrial significatifs (probabilité >0,5 et score Mitocarta >5). En vert sont indiqués les rapports d'expression patient/contrôle ≤0,5.



### 3. Conclusion

La cartographie génétique, que nous avons couplée à l'étude du transcriptome ainsi qu'au séquençage exome, n'a jusqu'à présent pas permis d'identifier le gène responsable de la maladie pour les familles KE et CO.

L'étude en BN-PAGE nous a apporté des informations supplémentaires par rapport à l'enzymologie sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Pour la famille CO, l'étude enzymologique du foie indiquait un déficit généralisé de l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire alors que celles des fibroblastes ne montrait aucun déficit. Le BN-PAGE sur fibroblastes nous indique un défaut d'assemblage de l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire. Pour la famille KE, on note que l'étude enzymologique du foie montrait seulement un déficit du complexe I et aucun déficit n'était observé dans les fibroblastes. Le BN-PAGE a révélé des défauts d'assemblage touchant tous les complexes de la chaîne respiratoire.

Le BN-PAGE nous a donc permis de détecter des anomalies non détectables par l'enzymologie. Ces données nous ont incités à considérer les patients des deux familles comme atteints de déficit multiple, ce qui a orienté les analyses de cartographie génétique, de transcriptome et d'exome vers l'étude de gènes impliqués dans la traduction, la transcription ou la réplication de l'ADNmt.

Dans les 2 familles étudiées, l'analyse transcriptomique a permis d'individualiser un petit nombre de gènes candidats sous-exprimés, présents dans les régions d'homozygotie ou d'haploïdentité, sans toutefois mettre en évidence de mutations. La sous-expression de ces gènes candidats, bien que statistiquement significative, n'a cependant pas une forte puissance statistique, étant donné que nous étudions les résultats patient par patient et non en groupe, du fait de l'hétérogénéité génétique de la cohorte. Nous n'avons pas noté de diminution drastique d'expression d'un transcrit, ce qui peut être dû au fait que la mutation en cause pour chacune de ces familles n'entraîne pas de diminution ni de dégradation du transcrit. On peut également émettre l'hypothèse que le gène causal, bien qu'ayant une expression ubiquitaire, s'exprime de manière tissu-spécifique. Le taux de transcrit dans les fibroblastes serait alors différent et non représentatif de celui présent dans les cellules du tissu atteint à savoir les hépatocytes.

La cartographie génétique seule a mis en évidence un grand nombre de régions d'haploïdentité pour la famille CO, du fait de la petite taille de cette famille, et deux régions d'homozygotie pour la famille KE. Le séquençage des meilleurs gènes candidats pour la famille CO et de tous les

---

gènes candidats pour la famille KE n'a pas permis d'identifier le gène causal. Une limitation de la technique de cartographie génétique est que l'ensemble du génome n'est pas entièrement couvert par les marqueurs SNP, en particulier les régions télomériques et péri-centromériques.

Nous avons donc soumis tous les individus atteints de ces deux familles multiplex KE et CO en séquençage haut débit exome, qui nous permet d'avoir accès à toutes les séquences exoniques de l'ensemble du génome. L'intérêt d'utiliser cette technique pour ces deux familles était que nous pouvions avoir plusieurs filtres supplémentaires : grâce à la cartographie génétique réalisée en amont, nous avons pu nous focaliser sur l'analyse des séquences comprises dans les régions candidates, et comparer les variations trouvées dans chaque gène avec le taux de ce transcrit obtenu par le transcriptome. Malgré la combinaison de toutes ces données, nous n'avons pas pu mettre en évidence le gène causal de la maladie pour les individus atteints de ces deux familles. Cela peut être dû aux autres limitations du séquençage exome, à savoir le manque de couverture de certaines régions notamment les régions riches en GC autour des exons 1, le fait que ce séquençage n'est réalisé que sur les exons et les régions introniques flanquantes et l'impossibilité de détecter des remaniements (délétions, insertions, duplications) supérieurs à quelques paires de bases.

Les perspectives pour le diagnostic moléculaire de ces deux familles seront de réaliser un séquençage génome entier afin d'avoir accès aux introns, aux séquences non codantes et régulatrices. Le séquençage « *whole genome* » permet de plus d'obtenir une meilleure couverture, notamment celle des exons 1, qui n'est pas optimale avec le séquençage exome.

## IV. HETEROGENEITE GENETIQUE DE LA COHORTE D'ATTEINTE HEPATIQUE SANS DEPLETION DE L'ADN<sub>MT</sub> : MOYENS D'ETUDE

Les atteintes hépatiques de l'enfant sans déplétion de l'ADN<sub>mt</sub> constituent un groupe génétiquement très hétérogène. En effet, chaque mutation décrite dans un nouveau gène associé avec cette atteinte ne concerne à chaque fois que quelques familles et quelques patients tout au plus. Il n'y a pas de gène majeur d'atteinte hépatique mitochondriale sans déplétion de l'ADN<sub>mt</sub> dans le foie, comme nous l'avons vu dans le chapitre II. Séquencer chaque nouveau gène identifié par l'étude d'un patient chez l'ensemble des patients de la cohorte ne s'avère donc pas une bonne stratégie. De plus, la plupart des patients, mises à part les familles AH, AZ, CO et KE, sont des cas sporadiques ou des individus issus de familles multiplex dont les ADN des autres membres de la famille ne sont pas disponibles, ce qui rend l'utilisation de la cartographie génétique, outil très informatif, inappropriée. Nous avons donc utilisé des approches globales d'étude pour les patients de cette cohorte.

### 1. Transcriptome

Le transcriptome désigne l'ensemble des ARNm transcrits à partir du génome. L'analyse du transcriptome d'une population cellulaire permet d'identifier et de quantifier les produits de l'expression des gènes dans ces cellules.

Nous avons réalisé deux analyses successives du transcriptome des patients de la cohorte. L'analyse est faite à partir des ARNm extraits des fibroblastes des patients en culture, (seul matériel disponible pour tous les patients), en tenant compte du fait que les gènes impliqués dans les maladies mitochondriales sont d'expression ubiquitaire.

La première analyse a été réalisée pour les 16 premiers patients de la cohorte, et 5 contrôles. Nous nous sommes assurés de la validité de cette approche en intégrant également dans cette étude 5 patients avec mutation dans le gène *DGUOK*. L'analyse du transcriptome de ces 5 contrôles positifs a rapidement montré une sous-expression de *DGUOK* démontrant la faisabilité de ce travail. Une deuxième analyse a par la suite été faite en prenant les fibroblastes de 44 autres patients (19 à 43 et 50 à 68) et 4 contrôles sains. Les deux analyses ne peuvent pas être comparées entre elles.

### a. Approche gène candidat

Nous avons analysé les données du transcriptome afin de mettre en évidence un ou plusieurs gènes sous-exprimés, résultant d'une mutation non-sens. Pour cela, nous avons regardé les gènes codant pour des protéines mitochondriales et présentant un rapport patient/contrôle inférieur à 0,5.

Chaque gène sous-exprimé chez un patient a été séquencé chez ce patient, mais également pour l'ensemble des patients de façon systématique. Il est en effet possible que d'autres patients présentent des mutations faux-sens de ce gène ne conduisant pas à une diminution de son expression.

Nous avons séquencé les gènes *MARS2* (methionyl-tRNA synthetase 2), *CMPK2* (cytidine monophosphate (UMP-CMP) kinase 2), *NFS1* (cysteine desulfurase, mitochondrial), *TRIT1* (tRNA isopentenyltransferase 1), *TRNT1* (tRNA nucleotidyl transferase, CCA-adding, 1), *GTPBP3* (GTP binding protein 3), *C12ORF72* (Methyltransferase like 20), *TRMT5* (tRNA methyltransferase 5), *METTL9* (methyltransferase like 9) et *METTL7A* (methyltransferase like 7A). L'ensemble de ces gènes ont été exclus par séquençage Sanger des exons et régions introniques flanquantes.

L'étude du transcriptome ne nous a pas permis de mettre en évidence de mutations dans un gène grâce à un transcrit ayant clairement une quantité diminuée chez un ou plusieurs patients de notre série. Les réductions importantes de l'expression d'un gène résultent en général de mutations non-sens ou de décalage du cadre de lecture conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré. L'incapacité à identifier le gène en cause par cette approche transcriptomique peut être due au fait que nos patients ne présentent pas ce type de mutations. On notera que sur l'ensemble du génome, un nombre très important de gènes sont sous-exprimés, à commencer par de nombreux gènes codant pour des protéines non mitochondriales, ce qui nous amènera à nous questionner sur la précision et la fiabilité à accorder aux résultats.

### b. Approche globale

Les patients présentant une atteinte hépatique mitochondriale sont hétérogènes génétiquement. Cependant, ils ont le même phénotype, et aucune donnée clinique ne peut permettre de les différencier et donc d'associer une clinique particulière à une mutation dans un gène particulier. Le but est donc de chercher un moyen de les différencier par d'autres données biologiques afin de faire des groupes, et ainsi faciliter les investigations génétiques.

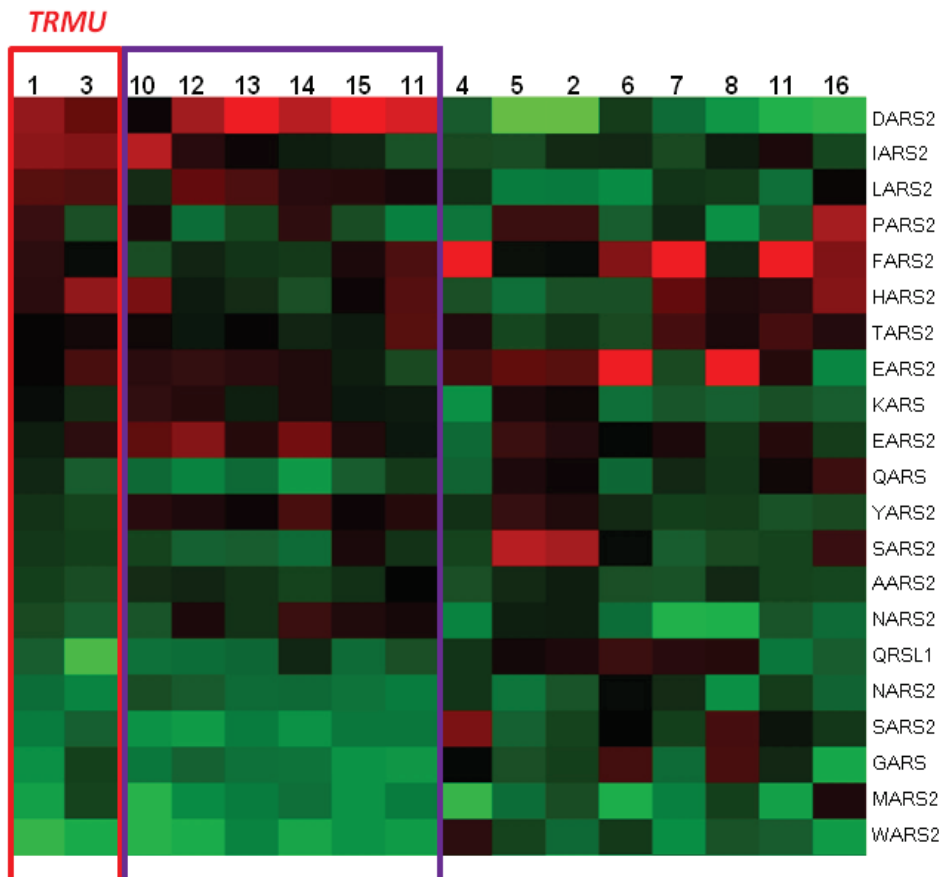
Nous avons donc par la suite utilisé l'analyse du premier transcriptome afin de détecter des voies métaboliques sur ou sous exprimées, et de constituer des groupes de patients ayant un profil similaire pour certaines familles de protéines ou fonctions cellulaires. Analyser les résultats en prenant des groupes de patients et non les patients individuellement augmente la puissance de l'analyse.

Nous avons tout d'abord comparé le transcriptome des patients 1 et 3, qui ont la même mutation dans le gène *TRMU*. Nous constatons que 95% des sondes communes aux deux patients (4556 sondes sur 4787) varient dans le même sens, ce qui semble indiquer l'existence de mécanismes identiques de réponse ou de compensation de la mutation du gène *TRMU*.

L'analyse par le logiciel Ingenuity permet d'organiser les modifications d'expression des différents gènes du transcriptome par voie métabolique ou fonction cellulaire, et ainsi de mettre en évidence des modifications touchant des grandes fonctions cellulaires en général. Cette analyse indique que les patients 1 et 3 ont une surexpression significative ( $p\text{-value}<0,05$ ) de voies métaboliques impliquées dans le métabolisme des acides aminés et des acides gras. On notera aussi une surexpression de la voie de biosynthèse des ARNt. Il est à noter qu'Ingenuity ne différencie pas la voie de biosynthèse des ARNt cytoplasmiques de ceux mitochondriaux. Les changements métaboliques observés sont en accord avec des résultats observés à partir d'une étude transcriptomique après invalidation par RNAi de protéines de la chaîne respiratoire chez *C. elegans* (Falk, Zhang et al. 2008).

En émettant l'hypothèse que les autres patients sont mutés dans des gènes différents mais appartenant tous à la traduction mitochondriale, nous avons ensuite décidé de cibler l'analyse du transcriptome autour de la traduction mitochondriale. Nous avons pour cela regardé plus précisément pour tous nos patients les variations d'expression des gènes codant pour les ARNt synthétases, les enzymes de modification des ARNt, les protéines ribosomales et les facteurs d'initiation et de terminaison de la traduction. Les résultats les plus significatifs concernent les gènes des ARNt synthétases (Figure 30).

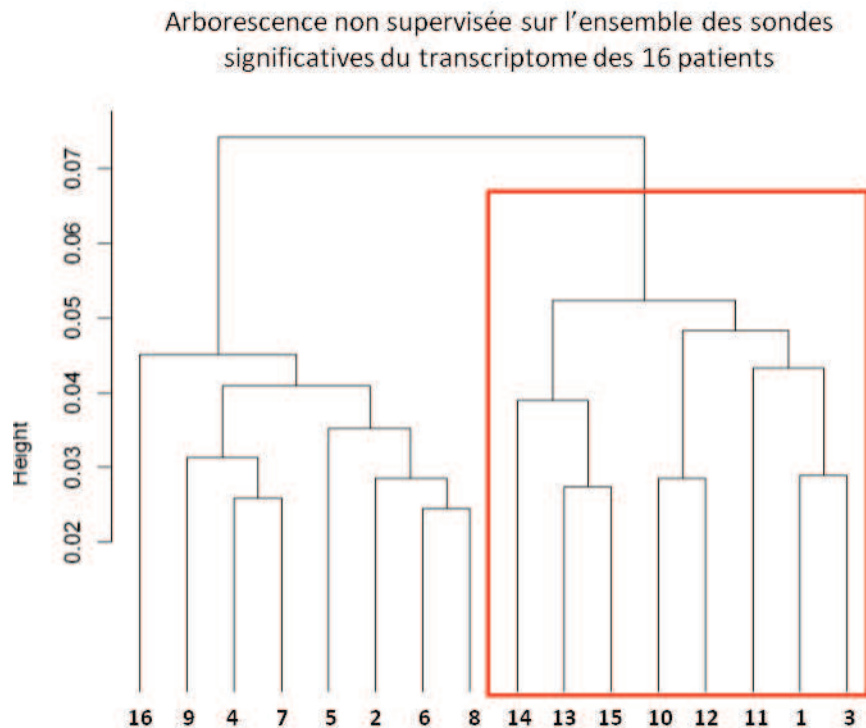
D'après cette figure, on note que les patients 10, 11, 12, 13, 14 et 15 ont un profil transcriptionnel similaire. Ces individus de plus ont un profil assez proche de celui des patients 1 et 3, mutés dans le gène *TRMU*.



**Figure 30 : Modification d'expression des gènes codant pour les ARNt synthétases mitochondriales chez les patients 1 à 16.**

*Les gènes les moins exprimés apparaissent en vert et ceux les plus exprimés en rouge. Les patients 10, 11, 12, 13, 14 et 15 (encadrés en violet) ont un profil transcriptionnel similaire, et proche de celui des patients 1 et 3 mutés dans TRMU (encadrés en rouge).*

Nous avons ensuite repris l'ensemble des résultats obtenus par l'analyse de toutes les sondes du transcriptome pour l'ensemble des 16 patients. Il apparaît clairement que les patients 1 et 3 d'une part et les patients 10, 11, 12, 13, 14, 15 d'autre part présentent des profils transcriptomiques relativement proches. Ainsi, l'arborescence présentée dans la Figure 31 confirme les résultats que nous avons observés au niveau des protéines de la traduction mitochondriale et nous confirme une certaine homogénéité de ce sous-groupe de patients.



**Figure 31 : Clustering non supervisé réalisé sur l'ensemble des sondes du transcriptome pour les 16 patients.**

*Les patients 1 et 3 d'une part et 10, 11, 12, 13, 14, 15 d'autre part (encadrés en rouge) présentent, en tenant compte de l'ensemble des sondes du transcriptome, un profil transcriptomique proche.*

Cependant, aucun des gènes codant des protéines de la traduction mitochondriale ne présente en transcriptome de sous-expression sévère dans ce sous-groupe de patients. Nous avons alors par la suite regardé la traduction mitochondriale pour ces patients afin de valider ou non l'hypothèse d'une anomalie de traduction mitochondriale suggérée par les données du transcriptome.

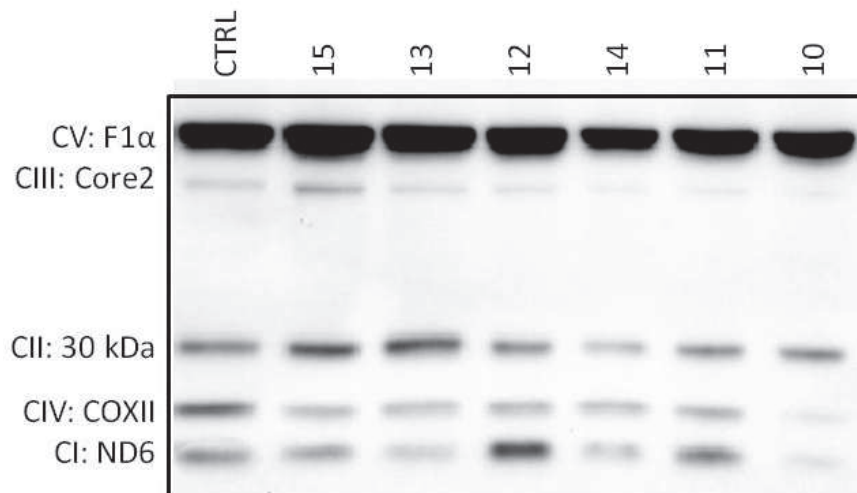
## 2. Traduction mitochondriale

Les anomalies de traduction mitochondriale conduisant à un déficit des protéines codées par l'ADNmt, nous avons tout d'abord comparé le niveau d'expression des protéines de la chaîne respiratoire codées par l'ADNmt et nucléaire par SDS-PAGE sur des mitoplastes extraits à partir de fibroblastes des patients et d'un contrôle.

Cette immunodétection est réalisée avec un cocktail d'anticorps reconnaissant une sous-unité de chaque complexe, afin d'apprécier l'abondance relative des différents composants de la

chaîne respiratoire. Sur les cinq sous-unités, F1 $\alpha$ , Core2 et 30 kDa sont codées par l'ADNn et COXII et ND6 sont codées par l'ADNmt.

Le SDS-PAGE (Figure 32) montre une nette diminution de la quantité des sous-unités mitochondriales COXII et ND6 spécifiques des complexes IV et I, pour le patient 10 par rapport au contrôle. Pour l'ensemble des autres patients, COXII est sous-exprimée mais l'expression de ND6 est variable.

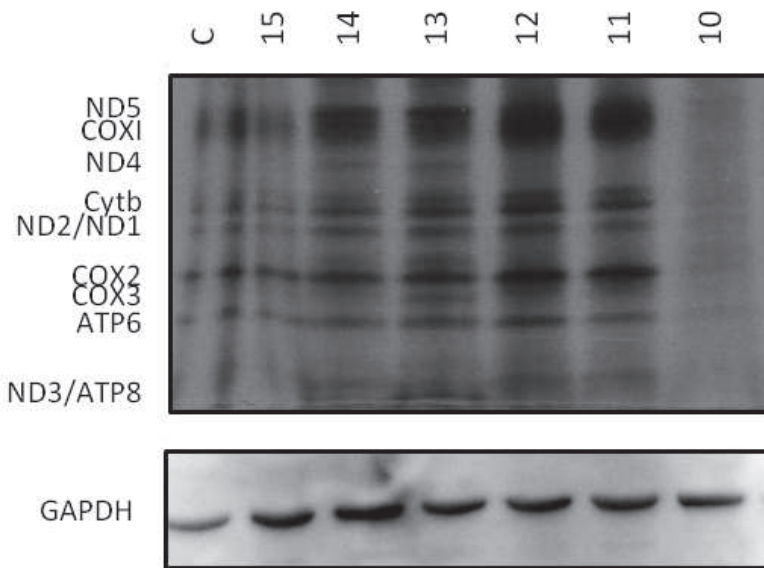


**Figure 32 : SDS-PAGE réalisé à partir de mitoplastes extraits de fibroblastes des patients 10, 11, 12, 13, 14 et 15 et d'un contrôle.**

*La solution d'immunodétection utilisée est constituée des anticorps anti-ND6 (sous-unité du CI) et anti-COX II (sous-unité du CIV), sous-unités codées par le génome mitochondrial, ainsi que des anticorps anti-30 KDa (sous-unité du CII), anti-core 2 (sous-unité du CIII), et anti-F<sub>1</sub> $\alpha$  (sous-unité du CV), sous-unités codées par le génome nucléaire. L'hybridation du complexe II nous sert de témoin de charge.*

La traduction mitochondriale dans les fibroblastes des patients 10, 11, 12, 13, 14, 15 a été étudiée *in vitro* par marquage radioactif avec de la méthionine marquée au <sup>35</sup>S. Les résultats montrent une diminution de la quantité de l'ensemble des protéines mitochondriales traduites chez le patient 10, (Figure 24) confirmant les résultats du SDS-PAGE. Nous confirmons donc la suspicion d'une anomalie de la traduction mitochondriale évoquée par l'analyse transcriptomique pour le patient 10. Les autres patients 11, 12, 13, 14, 15 ont peut-être une anomalie de traduction mitochondriale mais qui n'est pas exprimée dans leurs fibroblastes.





**Figure 33 :** Etude de la traduction *in vitro* par marquage à la méthionine  $^{35}\text{S}$  des protéines codées par l'ADNmt sur des fibroblastes des patients 10, 11, 12, 13, 14, 15 et d'un contrôle.

On observe une diminution de la traduction de l'ensemble des protéines codées par l'ADNmt pour le patient 10, par rapport au contrôle.

### 3. Séquençage haut débit exome

Bien que nous ayons suspecté pour un petit groupe de 6 patients une anomalie de la traduction mitochondriale, il n'est techniquement pas réalisable de séquencer tous les gènes impliqués dans la traduction mitochondriale. La cause génétique de l'ensemble des patients reste encore indéterminée. Nous avons alors retenu la technique du séquençage haut débit exome pour l'étude de cette cohorte, afin d'avoir accès à toutes les séquences codantes du génome.

#### a. Familles KE et CO

Le séquençage haut débit exome a été réalisé pour les individus atteints KE1, KE2, KE3, CO1 et CO2 des familles KE et CO, pour lesquels nous avons déjà réalisé une cartographie génétique. Cela nous a permis de combiner le séquençage haut débit exome avec les données de cartographie. Nous avons donc regardé, dans les régions d'homozygotie (KE) ou d'haploidentité (CO), les gènes codant pour des protéines à localisation mitochondriale ou prédite mitochondriale. Comme nous l'avons décrit dans le chapitre précédant, plusieurs gènes candidats ont été séquencés pour les deux familles, et tous ont été exclus.

## b. Individu IA1

Un séquençage haut débit exome a été réalisé pour le patient 10, que nous désignerons désormais IA1. Il s'agit de la fille atteinte de la famille IA, qui est une famille italienne non consanguine. Nous recherchons donc chez l'enfant atteint deux mutations hétérozygotes non répertoriées dans les bases de SNP dans un gène codant pour une protéine de localisation mitochondriale.

Le séquençage exome de ce patient a révélé la présence de deux mutations hétérozygotes dans le gène *NOX5* (NADPH oxidase 5). Ce travail sera détaillé dans le chapitre suivant **NOX5, NOUVEAU GENE D'ATTEINTE HEPATIQUE SANS DEPLETION DE L'ADN<sub>MT</sub>**.

## c. Autres patients présentant une atteinte hépatique

Concernant les autres patients de la cohorte, nous avons réalisé le séquençage haut débit exome pour une première série de 28 patients (patients 4, 5, 9, 19 à 43), puis pour deux familles indépendantes, une non consanguine (patients 44-45) et l'autre consanguine (patients 46-47), soit un total de 32 patients. Pour ces deux familles, le séquençage exome a été réalisé en première intention en prenant les deux frères et sœurs de chaque famille. Sur les 28 patients, deux (patients 20 et 27) sont issus de familles consanguines, pour lesquels aucun génotypage n'a été réalisé car nous ne disposons pas de l'ADN des autres individus de la famille. Pour ces derniers, nous recherchons une mutation homozygote non répertoriée dans les bases de SNP touchant un gène de localisation mitochondriale. Pour les 26 patients restants et les patients 44 et 45, nous recherchons deux mutations hétérozygotes composites non répertoriées dans les bases de SNP.

Le séquençage exome des 28 patients est analysé patient par patient pour les cas sporadiques. En revanche, les patients 44-45 ont été analysés en parallèle ainsi que les patients 46-47. Plusieurs variations ont été détectées, mais nous nous sommes focalisés sur celles impliquées dans des gènes ayant un lien avec les fonctions mitochondriales. Chaque variation sélectionnée est analysée grâce au logiciel Alamut qui donne un score de pathogénicité. Les variations qui nous paraissaient pertinentes ont également été vérifiées par séquençage classique Sanger afin de confirmer ou infirmer les données du séquençage haut débit. L'ensemble de ces données est résumé dans le Tableau 15.

Patient	Gène	Prédictions d'adressage mitochondrial				Prédictions de pathogénicité				Statut	Mutations exome	Sanger	Maladie connue	Conclusion
		P		Mp		Polyphen	SIFT	Modification d'épissage	Sanger					
		P	T P	Mp	Mc									
4	PRODH	0,86	0,783	0,9818	21	"Probably damaging"	"Deleterious"	non oui	- -	Hyperprolinémie type 1	Exclu car non pertinent			
11	DGUOK	0,82	0,871	0,9687	10	"Probably damaging"	"Deleterious"	non	Absent	Atteinte hépatique néonatale avec déplétion de l'ADNmt	Exclu car non retrouvée en Sanger			
11	MRP55	0,18	0,361	0,6846	13	"Probably damaging"	"Deleterious"	non	Confirmé		Mutations en cours de validation fonctionnelle			
23	AARS2	0,85	0,947	0,9973	12	"Probably damaging"	"Deleterious"	Non	Absent	Cardiomyopathie mitochondriale	Exclu car une seule mutation hétérozygote			
23	ALDH6A1	0,63	0,885	0,8762	17	-	-	oui	En cours En cours	3-Hydroxyisobutyrate acidurie	Séquençage Sanger des exons NC en cours			
25	PPA2	0,01	0,131	0,0560	13	"Probably damaging"	"Deleterious"	non oui	Confirmé Confirmé		Analyse de l'ADNC en cours			
25	AARS2	0,85	0,947	0,9973	12	"Probably damaging"	"Deleterious"	-	Absent	Cardiomyopathie mitochondriale	Exclu car non retrouvées en Sanger			
25	GLDC	0,68	0,770	0,9503	16	"Probably damaging"	"Deleterious"	non	En cours		Vérification en Sanger en cours			
25	ALDH6A1	0,63	0,885	0,8762	17	"Probably damaging"	"Deleterious"	non	En cours En cours	3-Hydroxyisobutyrate acidurie	Séquençage Sanger des exons NC en cours			
29	FH	0,94	0,955	0,9974	42	"Benign"	"Deleterious"	non non	- -	Encéphalopathie avec déficit fumarase	Exclu car non pertinent			
29	FASTKD2	0,04	0,430	0,6428	9	"Possibly damaging"	"Tolerated"	non non	- -	Encéphalomyopathie avec déficit isolé en CIV	Exclu car non pertinent			
29	MTHFD1	0,01	0,236	0,0225	6	"Benign"	"Tolerated"	non	En cours		Vérification en Sanger en cours			
29	NME4	0,81	0,837	0,9789	12	"Probably damaging"	"Deleterious"	non	Confirmé En cours		Séquençage Sanger de l'exon 1 NC en cours			
31	AARS2	0,85	0,947	0,9973	12	"Probably damaging"	"Deleterious"	non	Confirmé p.R10Q Htz	Cardiomyopathie mitochondriale	Deux mutations hétérozygotes			
32	ALDH1B1	0,86	0,862	0,9928	14	"Probably damaging"	"Deleterious"	non non	Confirmé Confirmé		Mutations en cours de validation fonctionnelle			

Patient	Gène	Prédictions d'adressage mitochondrial			Mutations exome	Statut	Prédictions de pathogénicité				Sanger	Maladie connue	Conclusion
		mitochondrial					Polyphen	SIFT	Modification d'épissage	Sanger			
		P	T P	Mp									
33	CARS2	0,20	0,759	0,4623	-	c.572-3_572-2del p.H310H	Hétérozygote Hétérozygote	- -	- -	non non	Confirmé Confirmé		Exclu car ADNc normal
33	MTUS1	0	0,067	0,0479	-4	c.3384+8G>A p.E1105Q	Hétérozygote Hétérozygote	- "Possibly damaging"	- "Tolerated"	non non	En cours Confirmé		Vérification en Sanger en cours
35	DGUOK	0,82	0,871	0,9687	10	p.F256X p.L219P	Hétérozygote Hétérozygote	"Probably damaging" "Probably damaging"	"Deleterious" "Deleterious"	non non	Confirmé Confirmé		Deux mutations hétérozygotes
38	DGUOK	0,82	0,871	0,9687	10	p.G188V	Homozygote	"Probably damaging"	"Deleterious"	non	Absent		Exclu car non retrouvée en Sanger
39	ALDH6A1	0,63	0,885	0,8762	17	p.Q281K exons 1, 8, 9 NC	Hétérozygote	"Probably damaging"	"Deleterious"	non	En cours En cours		Séquençage Sanger des exons NC en cours
42	TRMT5	0,3	0,570	0,6802	1	c.12-9_12-4del p.E367Q	Hétérozygote Hétérozygote	- "Possibly damaging"	- "Tolerated"	non non	En cours Confirmé		Vérification en Sanger en cours
44-45	MTUS1	0	0,067	0,0479	-4	p.A820D p.H575R	Hétérozygote Hétérozygote	"Probably damaging" "Possibly damaging"	"Deleterious" "Deleterious"	non non	Confirmé Confirmé		Mutations en cours de validation fonctionnelle
46-47	ABCB11	0	0,035	0,2928	-2	p.Y354X	Homozygote	-	-	non	Confirmé		Mutation p.Y354X

**Tableau 15 : Variations identifiées par séquençage haut débit exome.**

Les logiciels de prédiction d'adressage mitochondrial sont désignés par : P : Predotar ; TP : Target P ; Mp : Mitoprot ; Mc : Mitocarta ;  $\gamma$ GT : gamma-glutamyl-transpeptidase.

NC : Non Couverts par le séquençage exome.

L'estimation de la pathogénicité des variations est effectuée grâce aux logiciels de prédiction Polyphen et SIFT.

En jaune sont indiqués les scores d'adressage mitochondrial significatifs (probabilité >0,5 et score Mitocarta >5). En gris sont indiqués les gènes exclus et les variations non retrouvées en Sanger, en rouge les variations identifiées uniquement en Sanger, et en vert les variations confirmées en Sanger ainsi que les gènes ayant des mutations robustes.

Il est à noter que quelques variations identifiées en séquençage exome n'ont pas été retrouvées en séquençage Sanger et étaient donc des faux positifs générés par la technique de séquençage haut débit. C'est le cas des variations identifiées pour les gènes *AARS2* (alanyl-tRNA synthetase 2) (patients 23 et 25), ainsi que celles identifiées dans le gène *DGUOK* (patients 11 et 38).

Les variations mises en évidence dans le gène *CARS2* (cysteinyl-tRNA synthetase 2) (patient 33) sont exclues car nous avons vérifié que les variations introniques n'ont pas d'impact sur l'ARNm.

Certaines variations touchent des gènes déjà connus pour causer d'autres pathologies. C'est le cas du gène *PRODH* (proline déshydrogénase), dont les mutations sont responsables d'hyperprolémie de type 1 (Guilmatre, Legalic et al. 2010), de *FH* (fumarate hydratase) dont les mutations causent une encéphalopathie avec déficit de la fumarase (Bourgeron, Chretien et al. 1994), et des mutations de *FASTKD1* (FAST kinase domains 1) associées avec une encéphalomyopathie et un déficit isolé en complexe IV (Ghezzi, Saada et al. 2008). Ces variations ne sont donc pas retenues.

Plusieurs variations hétérozygotes ont été retrouvées pour les patients 23, 25 et 39 dans le gène *ALDH6A1*, codant pour une méthylmalonate semi-aldéhyde déshydrogénase. Des mutations de ce gène ont déjà été décrites comme responsable de 3-Hydroxyisobutyrate acidurie (Sass, Walter et al. 2012). Dans cette étude, le patient décrit a développé une maladie fébrile et est décédé d'une hépato-encéphalopathie à 2 ans. Deux exons du gène *ALDH6A1* sont non couverts par le séquençage exome. Le séquençage Sanger de ces deux exons non couverts est en cours. Si ce dernier révèle d'autres variations, nous considérerons ce gène comme un bon candidat car il peut s'agir d'un diagnostic différentiel de l'atteinte hépatique mitochondriale.

Les variations mises en évidence par le séquençage exome dans les gènes *PPA2* (pyrophosphatase inorganic 2), *GLDC* (glycine dehydrogenase (decarboxylating)), *MTHFD1* (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (NADP+ dependent) 1), *NME4* (non-metastatic cells 4) et *MTUS1* (microtubule associated tumor suppressor 1) (pour le patient 33) sont en cours de vérification par séquençage Sanger.

L'absence de couverture de l'exon 1 du gène *AARS2* (codant pour l'ARNt-alanyl synthétase) nous a conduits à le séquencer en Sanger et à identifier une mutation hétérozygote p.R10Q. Celle-ci est prédite comme *probably damaging* par Polyphen et *deleterious* par SIFT. Nous avons donc deux mutations robustes dans le gène *AARS2* pour le patient 31.

D'autres variations, ayant des scores de pathogénicité forts et confirmées en Sanger, semblent être robustes. C'est le cas des mutations p.A363T dans *MRPS5* codant pour la protéine ribosomale mitochondriale S5, p.Q962X et p.R10Q dans le gène *AARS2*, p.G193VfsX16 et p.G466R dans *ALDH1B1* (aldéhyde déshydrogénase 1B1 mitochondriale), p.A820D et p.H575R dans *MTUS1* (microtubule associated tumor suppressor 1) et p.Y354X dans *ABCB11* (ATP-binding cassette, sub-family B member 1).

La validation fonctionnelle est en cours pour l'ensemble de ces mutations.

La mutation homozygote p.Y354X dans le gène *ABCB11* a été identifiée pour les patients frères et sœurs 46-47 issus d'une famille consanguine qui ont été étudiés simultanément. Ce gène code pour une pompe à sels biliaires appelée BSEP (*Bile Salt Export Pump*). Des mutations dans ce gène sont responsables de cholestases intra-hépatiques progressives familiales (Strautnieks, Bull et al. 1998). Ce gène est bien le gène responsable de la maladie dans cette famille, puisque ce diagnostic était en effet évoqué avant de parler d'une atteinte hépatique d'origine mitochondriale.

Les deux mutations hétérozygotes p.A820D et p.H575R dans le gène *MTUS1* (microtubule associated tumor suppressor 1) ont été retrouvées pour les frères et sœurs 44-45 issus d'une famille multiplex non consanguine. Il a été démontré qu'un des transcrits de *MTUS1* code pour une protéine mitochondriale et agit comme un gène suppresseur de tumeurs (Seibold, Rudroff et al. 2003).

Enfin, le patient 35 présente deux mutations hétérozygotes dans le gène *DGUOK*. La première est une duplication de 4 paires de bases dans l'exon 6 (c.762\_765dup), qui interrompt le cadre de lecture prématurément entraînant le remplacement de l'acide aminé Phénylalanine 256 par un codon STOP (p.F256X). La deuxième mutation est une transition faux-sens dans l'exon 5 (c.656T>C) entraînant la substitution de la Leucine 219 par une Proline (p.L219P).

La recherche de déplétion dans le foie de ce patient n'avait pas été réalisée, par faute de matériel. Le fait que nous retrouvions des mutations dans le gène *DGUOK* chez ce patient nous indique que ce patient inclus dans le groupe des atteintes hépatiques mitochondriales sans déplétion fait en réalité partie du groupe de patients avec déplétion de l'ADNmt dans le foie.

Nous avons donc retrouvé des variations chez 12 patients sporadiques sur 28 et pour les quatre frères et sœurs des deux familles multiplex que nous avons séquencés en même temps.

Certaines variations n'ont pas été confirmées en Sanger, d'autres touchent des gènes impliqués dans d'autres pathologies, d'autres sont solides et restent à être validées notamment en étudiant leurs conséquences fonctionnelles sur la protéine. De plus, à l'exception du patient 35 muté dans *DGUOK*, aucune mutation dans un des gènes connus d'atteinte hépatique (*DGUOK*, *POLG*, *MPV17*, *PEO1*, *TRMU*, *GFM1*, *TSFM*, *LARS*) n'a pu être identifiée, montrant l'hétérogénéité génétique de cette cohorte de patients.

## 4. Conclusion

Malgré la très grande hétérogénéité génétique des atteintes hépatiques mitochondriales sans déplétion de l'ADNmt, nous avons, afin d'identifier de nouveaux gènes causaux, utilisé dans ce travail des approches globales d'étude : le transcriptome et le séquençage haut débit exome.

L'étude du transcriptome ne nous a pas permis de mettre en évidence un gène clairement sous-exprimé chez un ou plusieurs patients de notre cohorte. Ceci peut s'expliquer par plusieurs raisons. Tout d'abord, l'analyse du transcriptome est réalisée à partir de fibroblastes en culture. Même si les gènes de protéines mitochondriales sont d'expression ubiquitaire, leur expression peut toutefois être différente dans les fibroblastes et les hépatocytes (cellules du tissu atteint). De plus, comme il est fort probable que les patients, même s'ils présentent le même phénotype clinique, n'ont pas tous le même gène muté, l'analyse du transcriptome dans le but de détecter un gène fortement sous-exprimé doit se faire indépendamment pour chaque patient, ce qui diminue la puissance de l'analyse. D'autre part, les réductions importantes de l'expression d'un gène résultent en général de mutations non-sens ou de décalage du cadre de lecture conduisant à l'apparition d'un codon stop prématuré. Si nos patients ne présentent pas ce type de mutations, il est alors impossible d'identifier le gène en cause par une approche transcriptomique.

Néanmoins, l'étude du transcriptome nous a permis de mettre en évidence un groupe de patients ayant globalement le même profil transcriptionnel. Ce profil s'est confirmé quand l'analyse s'est restreinte aux gènes impliqués dans la traduction mitochondriale. L'étude de la traduction *in vitro* sur fibroblastes a effectivement montré une anomalie de traduction mitochondriale pour un des patients. Ces expériences n'ont pas révélé d'anomalie de traduction mitochondriale pour les autres patients, ce qui n'implique pas forcément qu'ils n'aient pas d'anomalie, car les fibroblastes n'expriment pas toujours ce type de déficit (c'est le cas notamment des mutations de *DARS2* (Scheper, van der Klok et al. 2007)).

Les autres patients de la cohorte ont un profil transcriptionnel différent, ce qui nous incite à penser que soit les régulations ou les compensations mises en jeu sont différentes, soit l'anomalie génétique touche un gène qui n'est pas impliqué dans la traduction mitochondriale.



Devant l'incapacité de mettre en évidence le gène causal par l'approche transcriptomique, nous avons retenu la technique du séquençage haut débit exome pour l'étude de cette cohorte. Nous l'avons tout d'abord réalisé pour les individus atteints des familles consanguines KE et CO pour lesquelles nous avons déjà réalisé une cartographie génétique. Ces résultats de génotypage constituent en effet un filtre supplémentaire et permettent de ne considérer que les gènes contenus dans les régions d'homozygotie ou d'haploïdentité. Malheureusement, aucun gène n'a été identifié pour ces deux familles comme nous l'avons décrit précédemment.

Pour le reste des patients de la cohorte, le séquençage exome a révélé des variations pour 12/28 des patients, et pour 4/4 patients des deux familles dont les deux enfants atteints ont été étudiés simultanément. Certaines variations identifiées dans les gènes *DGUOK* et *AARS2* n'ont pas été confirmées en Sanger et étaient des faux positifs. A l'inverse, nous avons identifié par séquençage Sanger pour le patient 31 une mutation dans un exon du gène *AARS2* non couvert par le séquençage exome. Des mutations dans le gène *AARS2* ont déjà été décrites comme associées à une cardiomyopathie mitochondriale (Gotz, Tynismaa et al. 2011). Les mutations retrouvées chez notre patient ayant une atteinte hépatique mitochondriale montrent l'hétérogénéité phénotypique au sein des gènes impliqués dans la traduction mitochondriale.

En prenant en compte l'ensemble des patients que nous avons étudiés grâce à plusieurs séquençages exome, nous avons au total identifié par séquençage exome des variations pour 13/29 (soit 45%) des patients séquencés individuellement, et pour 4/9 (soit 44%) des patients frères et sœurs séquencés parallèlement. Sur l'ensemble de ces variations, certaines déjà validées en Sanger impliquent des gènes non connus pour causer des atteintes hépatiques mitochondriale, nous paraissent robustes et font l'objet de validation fonctionnelle. Il s'agit des mutations dans le gène *MRPS5* codant pour la protéine ribosomale mitochondriale S5, le gène *AARS2* dont nous avons parlé ci-dessus, le gène *ALDH1B1* codant pour une aldéhyde déshydrogénase mitochondriale, le gène *MTUS1* (microtubule associated tumor suppressor 1) dont l'un des transcrits code pour une protéine mitochondriale et le gène *NOX5* codant pour la NADPH oxydase 5.

21/38 patients, soit environ 55% des patients restent cependant sans cause génétique identifiée. Ceci peut être dû aux limites de l'exome. Certaines séquences ont une faible profondeur et d'autres ne sont pas couvertes, notamment les exons ayant des régions riches en GC. De plus, des mutations introniques ou des grandes délétions ne peuvent pas être détectées par ce séquençage. Enfin l'hétérogénéité génétique de notre cohorte de patients est un frein majeur à

l'identification des gènes en causes. En effet, ceci nous a obligé à étudier ces patients un par un, ce qui diminue la puissance de l'analyse. En revanche, l'analyse d'un exome peut être beaucoup plus facile quand deux frères et sœurs sont étudiés en parallèle. Ceci est illustré par les patients 44-45 et 46-47, pour qui un gène a été très rapidement mis en évidence. Malheureusement pour nous, le gène *ABCB11* mis en évidence pour les patients 46-47 n'est pas un gène codant pour une protéine mitochondriale. Ce résultat souligne également la difficulté du diagnostic clinique.

## V. *NOX5*, NOUVEAU GENE D'ATTEINTE HEPATIQUE MITOCHONDRIALE SANS DEPLETION DE L'ADN<sub>MT</sub>

### 1. Séquençage haut débit exome chez la patiente IA1

#### a. Présentation clinique

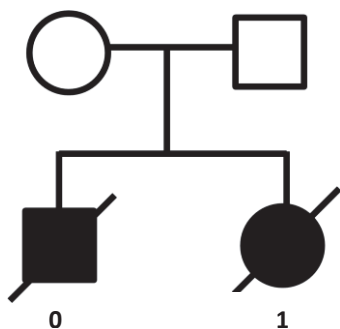


Figure 34 : Arbre généalogique de la famille IA.

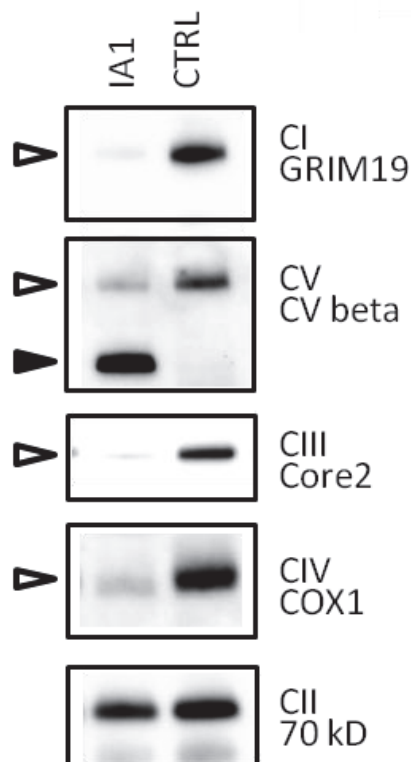
L'individu IA1 est issu d'une famille non consanguine italienne (Figure 34). Le premier enfant (IA0) de la famille est un garçon ayant présenté en période néonatale un ictère prolongé, une insuffisance hépatique ainsi qu'une hypoglycémie. Il est décédé à 4 mois d'un coma hépatique. Aucune investigation n'a été réalisée à l'époque chez cet enfant et nous n'avons donc accès à aucun échantillon ou prélèvement.

L'enfant IA1 est une fille née à 40 semaines de grossesse. Elle a développé à 2 mois un ictère, une insuffisance hépatique, des difficultés d'alimentation engendrant une mauvaise prise pondérale, ainsi qu'une hypotonie axiale et périphérique. Le bilan biologique montre une hyperlactacidémie, une élévation du rapport lactate/pyruvate (L/P=21), une cholestase (PAL=420 UI/L, normale 75-20); ainsi qu'une cytolyse discrète (ASAT=58 UI/L, normale 10-40 UI/L, ALAT=37 UI/L, normale 5-30 UI/L). Les  $\gamma$ GT sont augmentés (266 UI/L, normale 5-20). Elle n'a pas de déplétion dans le foie (52% de la quantité normale d'ADN<sub>mt</sub>). L'étude enzymologique de la chaîne respiratoire mitochondriale montre un déficit du complexe IV dans un homogénat de foie, et des activités normales dans les fibroblastes et le muscle. La patiente IA1 est décédée à 3 ans.

## b. Etude biochimique

Nous avons réalisé une étude de l'assemblage de la chaîne respiratoire sur les mitoplastes extraits des fibroblastes de la patiente IA1 (Figure 35). Le BN-PAGE révèle un défaut quantitatif des complexes I, III, IV et V assemblés par rapport au contrôle. Il existe de plus un défaut qualitatif du complexe V avec la présence d'un sous-complexe de plus bas poids moléculaire mis en évidence avec l'anticorps dirigé contre la sous-unité  $\beta$  de l'ATPase.

Ce profil est assez semblable à ceux des patients mutés dans les gènes *GFM1* (Galmiche, Serre et al. 2012), *MRPL3* (Galmiche, Serre et al. 2011) ou *TSFM* (Vedrenne, Galmiche et al. 2012) tous impliqués dans la traduction mitochondriale.



**Figure 35 : BN-PAGE réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes de la patiente IA1 et d'un contrôle.**

Les quantités des complexes I, III, IV et V sont diminuées chez l'individu IA1 par rapport au contrôle (flèches blanches) et un sous-complexe de plus bas poids moléculaire est révélé par l'anticorps anti-CV beta chez la patiente (flèche noire).

### c. Etude génétique : séquençage haut débit exome

Un séquençage haut débit exome a été réalisé pour la patiente IA1. Nous recherchons chez l'enfant atteint deux mutations hétérozygotes non répertoriées chez les bases de SNP ou ayant une fréquence de l'allèle muté inférieur à 1%. Les résultats globaux sont donnés dans le Tableau 16 :

	Variations hétérozygotes	Variations hétérozygotes « composites »	Variations homozygotes
<b>Variations totales</b>	12786	6217	9807
<b>Variations non répertoriées (dbSNP et 1Kb génome)</b>	828	326	337
<b>Gènes codant des protéines mitochondriales ayant des variations non répertoriées</b>	37	4	16

Tableau 16 : Résumé des variations détectées par l'analyse de l'exome du patient IA1.

Les 4 gènes ayant deux mutations hétérozygotes codant pour des protéines de localisation mitochondriale sont : *GLYAT* (Glycine N-acyltransferase), *GPI* (Glucose-6-phosphate isomerase), *GLDC* (Glycine dehydrogenase) et *FITM2* (Fat storage-inducing transmembrane protein 2). Pour les gènes *GPI*, *FITM2* et *GLDC*, une des deux variations est une variation synonyme et n'est pas prédite pour provoquer une modification d'épissage. Pour le gène *GLYAT*, les deux variations concernent deux nucléotides successifs compris dans le même acide aminé, et par conséquent ne provoquent la substitution que d'un seul acide aminé. Les variations dans ces gènes ont donc été exclues.

Nous avons alors considéré les autres gènes comportant deux mutations hétérozygotes. Parmi ceux-ci, le gène *NOX5* (NADPH oxidase 5) a particulièrement attiré notre attention. Nous avons considéré ce gène comme un bon candidat chez les enfants atteints de la famille KE car il faisait partie d'une région d'homozygotie. La protéine *NOX5* n'est pas répertoriée comme une protéine mitochondriale, mais au cours de l'étude systématique des gènes de la région d'homozygotie des patients KE, nous avons observé qu'il existait 6 isoformes de *NOX5*, dont la plus courte, *NOX5ε*, est fortement prédite pour avoir une localisation mitochondriale (Figure 36).

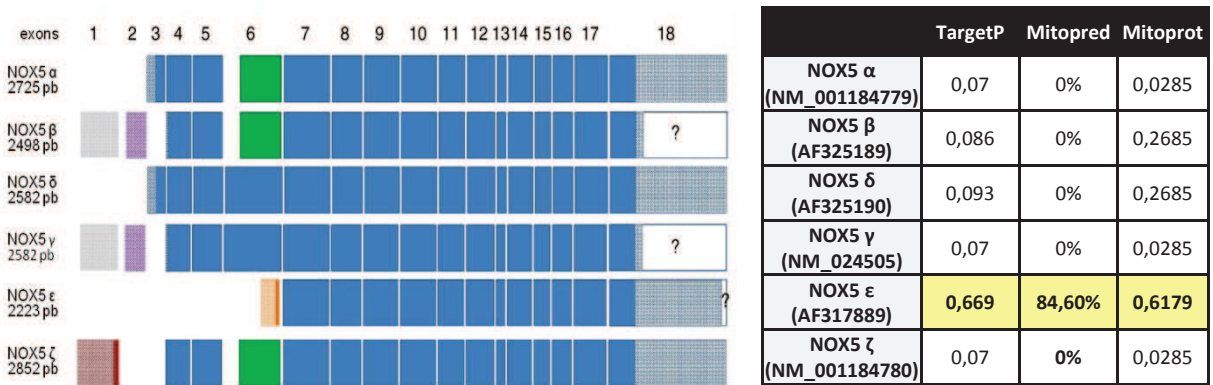


Figure 36 : A gauche : représentation schématique des isoformes de la protéine NOX5. A droite : scores de prédiction d’adressage mitochondrial pour les 5 isoformes de la protéine NOX5.

En jaune sont indiqués les scores d’adressage mitochondrial significatifs (probabilité >0,5 et pourcentage Mitopred >50%).

La protéine NOX5 est une NADPH oxydase de la famille des NOX protéines. La famille des protéines NOX comprend 5 protéines: NOX1, NOX2 (gp91<sup>phox</sup>), NOX3, NOX4, NOX5. Toutes ont une structure commune : elles sont constituées de 6 domaines transmembranaires (dont 2 domaines de liaison à l’hème) ainsi qu’un domaine C-terminal cytosolique (FAD et NADPH binding domains). La protéine NOX5 se distingue des autres protéines NOX car elle possède une extension N terminale avec 4 domaines EF-hands qui fixent le Ca<sup>2+</sup>, et des jonctions intron-exon différentes par rapport aux autres protéines de la même famille. Il existe une distance évolutive entre NOX5 et les autres NOX protéines (Figure 37).

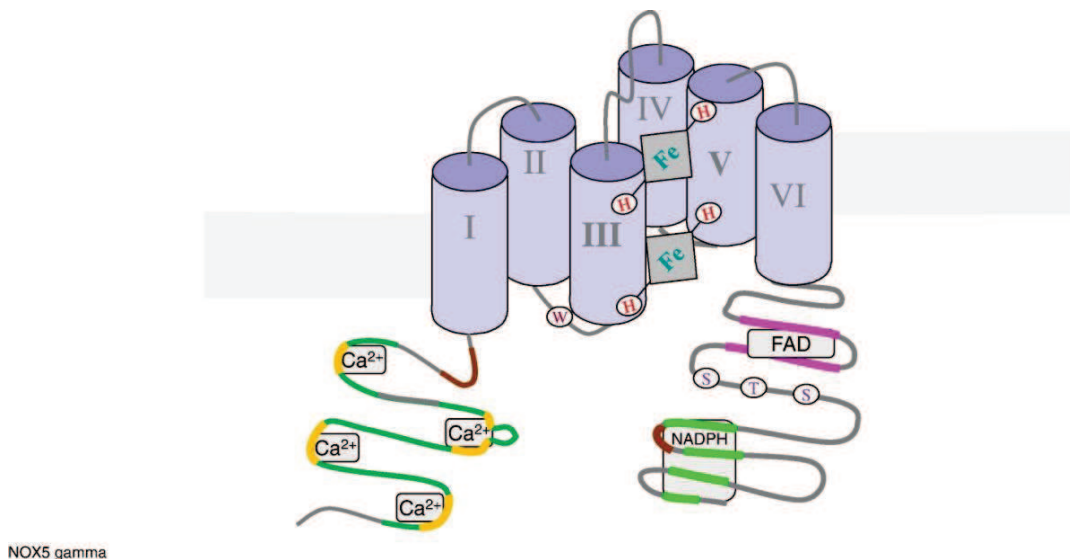


Figure 37 : Représentation schématique de l’isoforme la plus longue (γ) de la protéine NOX5.

Le séquençage exome a révélé deux mutations hétérozygotes, une transition (c.1336 G>A) dans l'exon 10 aboutissant à la substitution p.V446M dans le domaine FAD-binding 8 de la protéine, et une transition intronique (c.1648-3 C>T) trois nucléotides avant le début de l'exon 13, exon situé également dans le domaine FAD-binding 8. L'acide aminé Valine 446 est peu conservé entre les espèces, mais très conservé au sein de la famille des protéines NOX (Figure 38).

La mutation p.V446M est prédite comme « *possibly damaging* » par Polyphen et « *tolerated* » par SIFT. D'après plusieurs sites de prédiction des effets des mutations sur l'épissage (SpliceSiteFinder-like, MaxEntScan, NNSPLICE, Human Splicing Finder), la mutation c.1648-3 C>T entraînerait l'abolition de plusieurs sites d'épissage ESE (*Exonic Splicing Enhancer*). L'exon 13 placé en aval de cette mutation est constitué d'acides aminés moyennement conservés entre les espèces, et n'est pas retrouvé chez les autres protéines NOX (Figure 38).

Ces deux mutations sont absentes chez 510 chromosomes contrôles de même origine ethnique.

La mutation c.1336 G>A est retrouvée à l'état hétérozygote chez le père, mais la mutation c.1648-3 C>T n'est retrouvée ni chez la mère ni chez le père. Il s'agirait donc d'une néo-mutation apparue chez l'enfant (Figure 38).

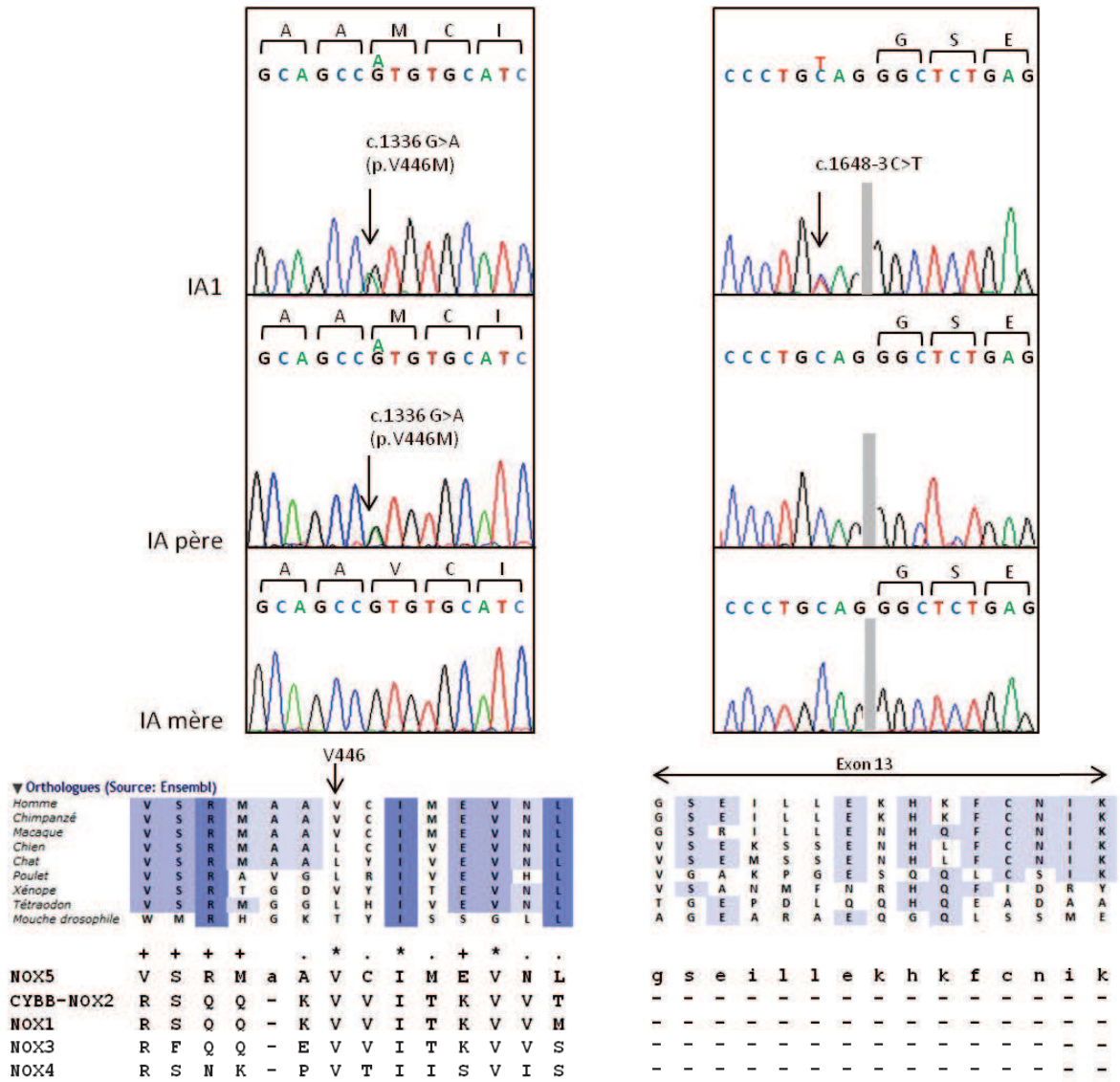
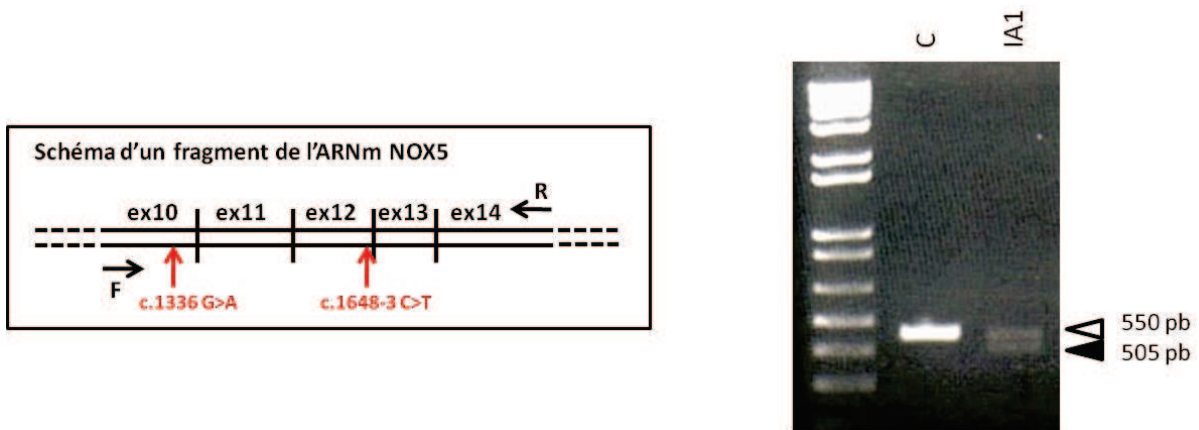


Figure 38 : Haut : Séquences du gène *NOX5* montrant la substitution c.1336 G>A transmise par le père IA, et la néo-mutation c.1648-3 C>T chez l'enfant IA1. Bas : Conservation de la Valine 446 et des acides aminés de l'exon 13 entre différents orthologues de *NOX5* et les différentes protéines de la famille *NOX*.

Afin d'étudier l'effet éventuel de la mutation c.1648-3 C>T sur l'épissage de l'exon 13, nous avons amplifié en RT-PCR l'ARNm de la patiente extrait de fibroblastes au moyen d'oligonucléotides situés dans les exons 10 et 14. Ceci a révélé la présence de deux espèces d'ARNm, un de taille normale (550 bp) et un de plus petite taille (505 pb). Ces deux espèces d'ARNm sont présentes en quantité nettement plus faible par rapport à l'ARNm *NOX5* contrôle (Figure 39).

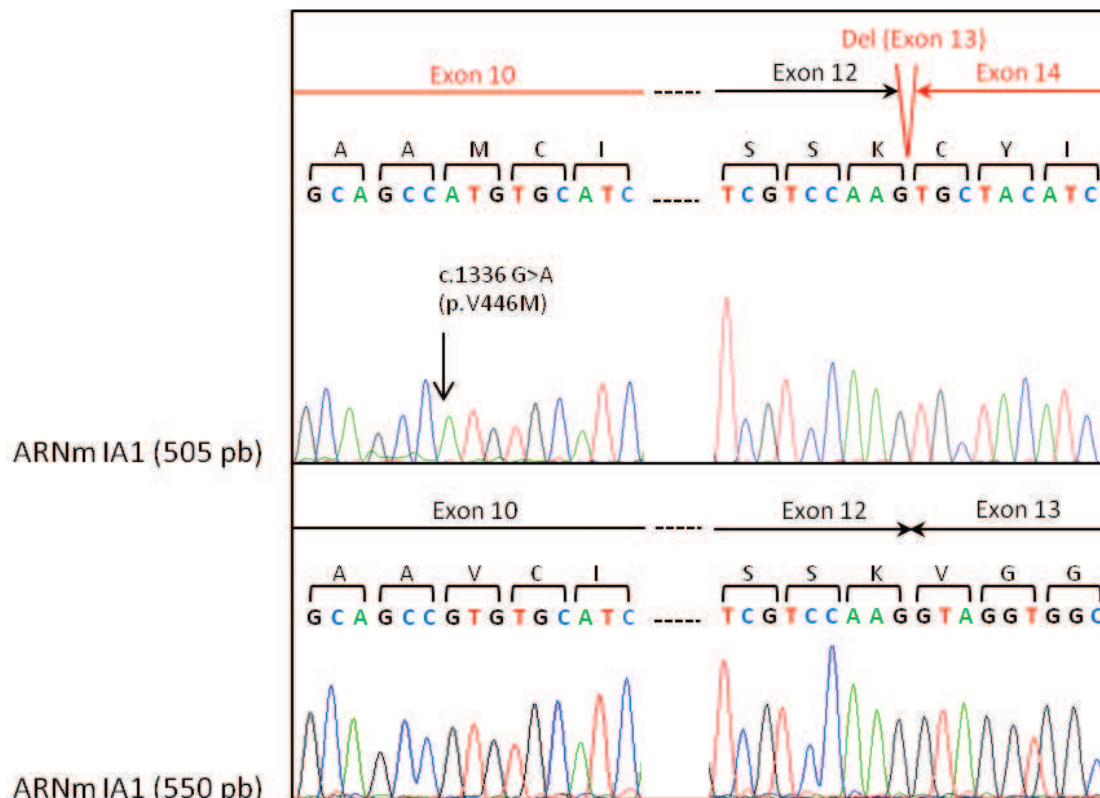




**Figure 39 :** A gauche : Structure d'une partie du gène NOX5. A droite : Electrophorèse des produits de RT-PCR réalisée sur les ARN extraits de fibroblastes de la patiente IA1 et d'un contrôle (C).

Les mutations *c.1336 G>A* et *c.1648-3 C>T* sont indiquées par des flèches rouges. Les oligonucléotides sens (F) et anti-sens (R) sont situés dans les exons 10 et 14 (flèches noires). Le produit PCR chez le contrôle fait 550 pb (flèche blanche). On observe l'amplification d'un fragment de taille normale (550 pb, flèche blanche), ainsi que d'un fragment de taille inférieure (505 pb, flèche noire) chez la patiente IA1, tous deux en quantité plus faible par rapport à l'amplification contrôle.

Les deux fragments PCR ont été découpés et séquencés séparément. Le séquençage a mis en évidence que les deux mutations sont situées sur le même allèle. L'espèce ARNm plus courte (505 pb) contient la mutation *c.1336G>A*, ainsi que la perte totale de l'exon 13 en phase causée par la deuxième mutation *c.1648-3 C>T*. La deuxième espèce d'ARNm (550 pb) ne présente aucune mutation (Figure 40).



**Figure 40 : Séquences des deux espèces d'ARNm NOX5 de la patiente IA1.**

L'espèce ARNm plus courte (505 pb) comporte les deux mutations c.1336G>A et c.1648-3 C>T. La mutation c.1648-3 C>T provoque la perte totale de l'exon 13 en phase. La deuxième espèce d'ARNm (550 pb) ne présente aucune mutation.

Cependant, les deux espèces d'ARNm sont présentes en quantité plus faible. Il semble donc d'une part que les deux mutations en cis c.1336 G>A et c.1648-3 C>T conduisent à un transcrit instable et d'autre part qu'il doit exister un autre événement de mutation sur l'espèce d'ARNm apparemment sauvage et conduisant à une baisse de sa quantité.

## 2. Séquençage Sanger dans la cohorte d'atteinte hépatique mitochondriale

Le séquençage des 16 exons codants et des 2 exons non codants du gène NOX5 ainsi que leurs régions introniques flanquantes a été réalisé pour l'ensemble des 70 individus de la cohorte d'atteinte hépatique mitochondriale.

Ce séquençage a révélé la présence de mutations seulement chez deux autres patients de la cohorte.

a. Présentation clinique des patients

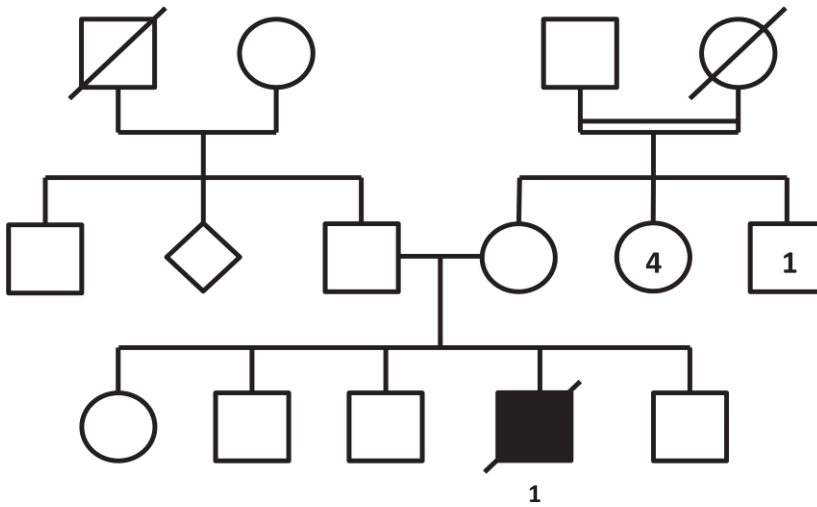


Figure 41 : Arbre généalogique de la famille TO.

La famille TO est une famille non consanguine Africaine originaire de Côte d'Ivoire (Figure 41). L'enfant TO1 est né à 36 semaines de grossesse. Il a déclaré dès le 14<sup>e</sup> jour une insuffisance hépatique, une cholestase et un ictère avec un taux de bilirubine totale de 423  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ . Le bilan biologique montre une hyperlactacidémie (3,5 mM, normale <2,2 mM), une augmentation des ALAT (380 UI/L, normale 5-30) et des ASAT (1200 UI/L, normale 10-40 UI/L), des PAL (831 UI/L, normale 75-240 UI/L) et des  $\gamma\text{GT}$  (100 UI/L, normale 5-20). Il ne présentait pas de signes neurologiques. La quantité d'ADNmt dans le foie était normale. Les études enzymologiques ont montré un déficit des complexes I et IV sur l'homogénat de foie et sur les mitochondries de muscle. Il est décédé à 3 mois d'une aggravation de son insuffisance hépatique et d'une défaillance multiviscérale.

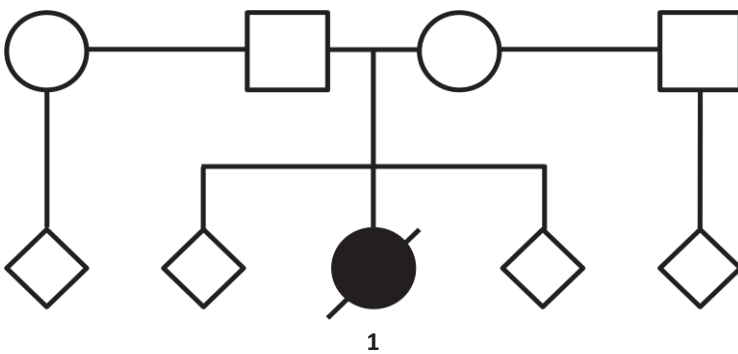
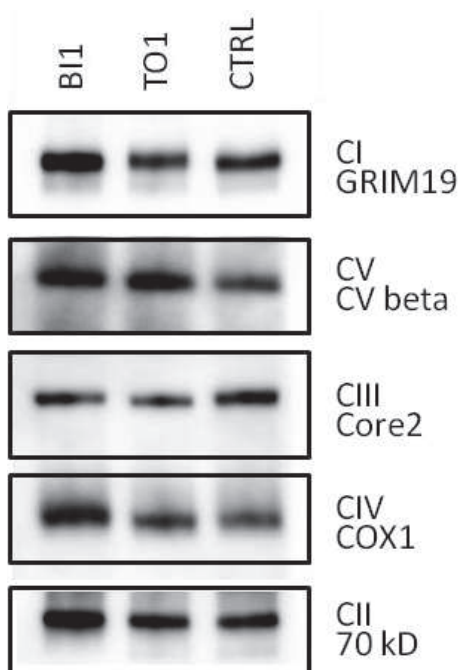


Figure 42 : Arbre généalogique de la famille BI.

La famille BI est une famille non consanguine (Figure 42). Deux premiers enfants sont nés sans problèmes notoires. Le troisième enfant est la fille BI1, née à 38 semaines de grossesse. A J1, elle a déclaré les premiers signes de la maladie : un ictère, la présence de selles blanches et une insuffisance hépatique accompagnée d'une cholestase. Le bilan biologique a montré une hyperlactacidémie, une augmentation des ALAT (64 UI/L, normale 5-30) et des ASAT (146 UI/L, normale 10-40 UI/L), des PAL (831 UI/L, normale 75-240 UI/L) et des  $\gamma$ GT (100 UI/L, normale 5-20 UI/L). Elle n'a développé aucun signe neurologique. Elle n'a pas de déplétion de l'ADNmt dans le foie. L'enzymologie montre un déficit du complexe IV dans l'homogénat de foie, et un déficit du complexe I dans les mitochondries de muscle. Elle est décédée à 3 mois d'une aggravation de son insuffisance hépatique, et n'a pas subi de transplantation hépatique du fait de son poids trop faible.

### b. Etude biochimique

L'étude en BN-PAGE sur les mitoplastes extraits des fibroblastes des patients TO1 et BI1 n'a pas révélé d'anomalie d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire (Figure 43).



**Figure 43 : BN-PAGE réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes des patients BI1 et TO1.**

*Les quantités des complexes I, III, IV et V sont normales chez les patients BI1 et TO1 par rapport au contrôle (CTRL).*

**c. Etude génétique**

Pour le patient BI1, une délétion hétérozygote de trois paires de bases (c. 2193\_2195delAAG) dans l'exon 18 du gène *NOX5* a été retrouvée. Ceci entraîne la perte du résidu Lysine 732 (p.K732del), acide aminé très conservé entre les espèces, dans un domaine Ferric reductase, NAD binding de *NOX5*. La délétion de la Lysine 732 est prédite comme « *possibly damaging* » par Polyphen et « *deleterious* » par SIFT. Cette mutation est transmise par la mère, qui la porte à l'état hétérozygote comme sa fille (Figure 44).

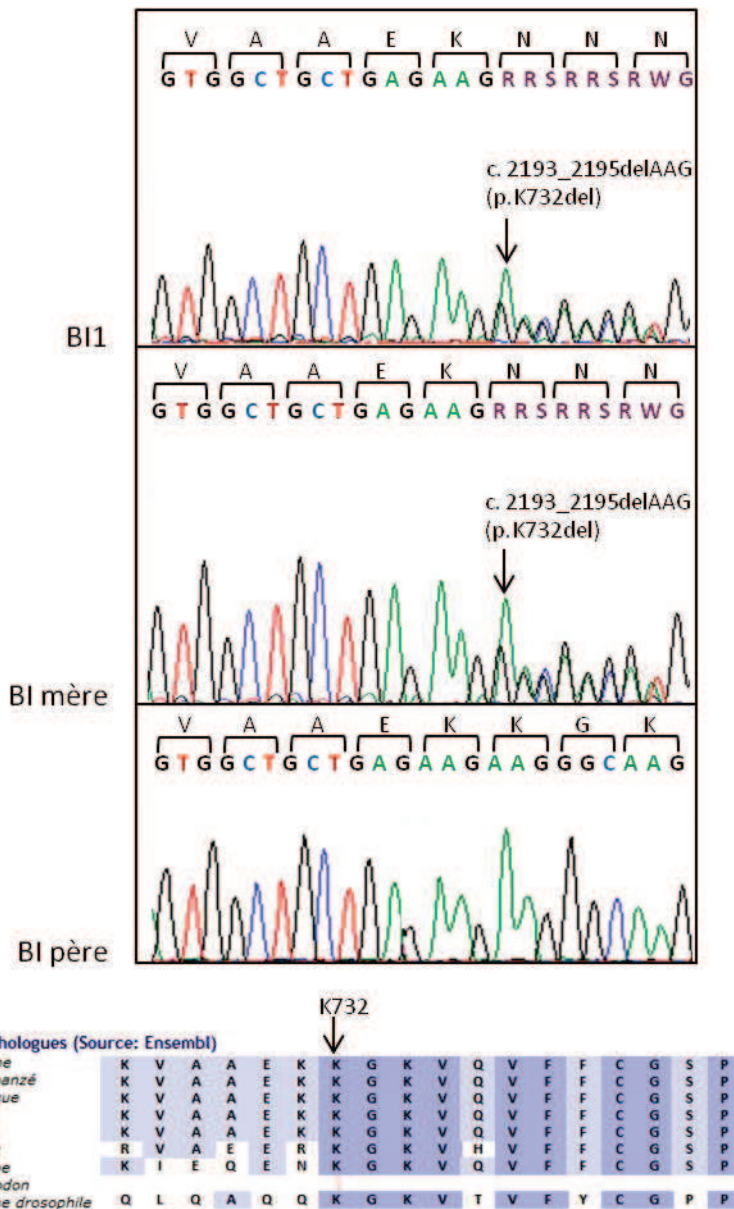


Figure 44 : Haut : Séquences du gène *NOX5* montrant la délétion p.K732del retrouvée à l'état hétérozygote chez le patient BI1 et transmise par sa mère. Bas : Conservation de la Lysine 732 entre des orthologues de *NOX5*.

Pour le patient TO1, nous avons détecté une transition (c. 896C>T) dans l'exon 8 du gène *NOX5*, conduisant à la modification protéique p.T299M. Cette mutation est transmise par la mère, qui est hétérozygote pour cette mutation également (Figure 45). Cette substitution hétérozygote non synonyme induit le changement de l'acide aminé thréonine en méthionine à la position 299 de la protéine dans le domaine protéique Ferric reductase-like transmembrane component, N-terminal. L'acide aminé thréonine est très conservé entre les espèces. Cette mutation est prédite par Polyphen 2 comme étant « *probably damaging* » avec un score de 1 sur une échelle allant de 0 à 1 et « *deleterious* » par SIFT.

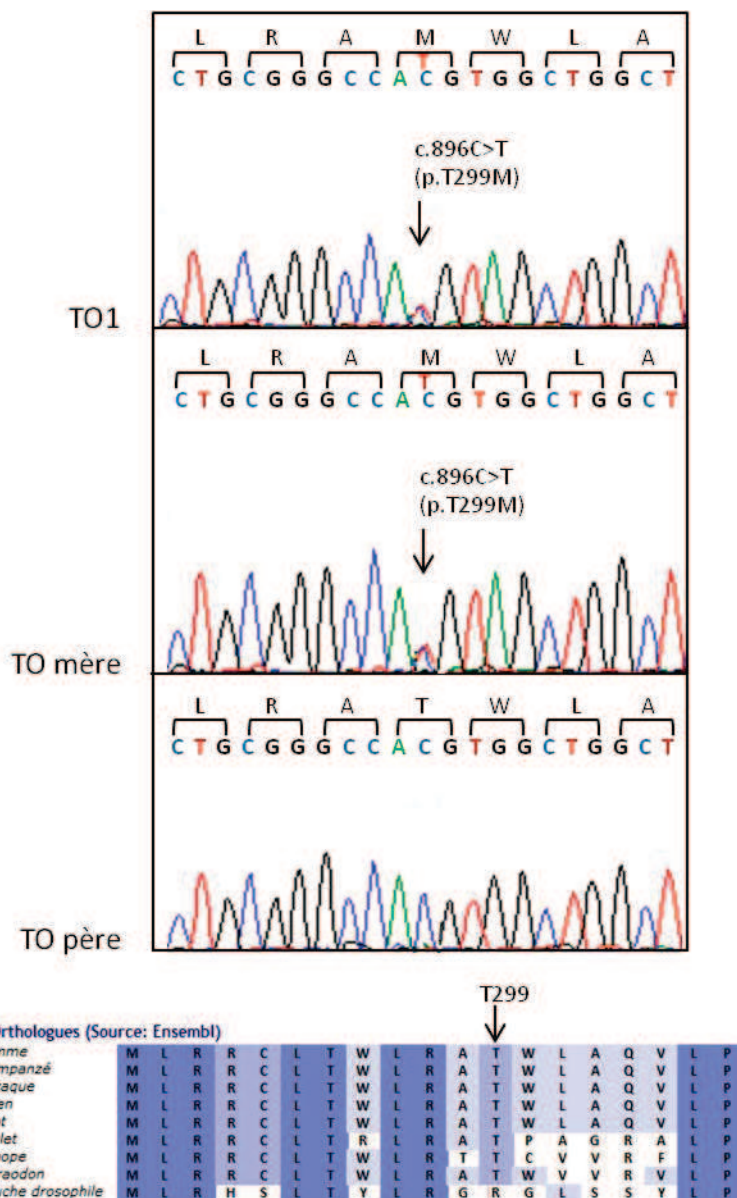


Figure 45 : Haut : Séquences du gène *NOX5* montrant la substitution p.T299M chez le patient TO1 transmise par sa mère. Bas : Conservation de la Thréonine 299 entre des orthologues de *NOX5*.



Les patients BI1 et TO1 sont issus de parents non consanguins. Nous recherchons donc sous l'hypothèse d'une maladie récessive la présence de deux mutations hétérozygotes composites. Puisque nous n'avons pas détecté d'autre mutation dans les exons et les régions introniques flanquantes de l'ADN génomique de ces patients, nous avons alors étudié les transcrits de *NOX5* afin de détecter d'éventuelles anomalies qualitatives ou quantitatives, reflet de la présence d'une mutation intronique.

Nous avons effectué une reverse transcription sur l'ARN extrait de cultures de fibroblastes de chaque patient. L'ADNc du gène *NOX5* a été amplifié à l'aide d'amorces exoniques, puis séquencé.

La délétion hétérozygote c. 2193\_2195delAAG a été retrouvée sur l'ADNc du patient BI1 à l'état hétérozygote (Figure 46). Le séquençage de l'intégralité de l'ADNc du patient n'a pas montré d'autres anomalies.

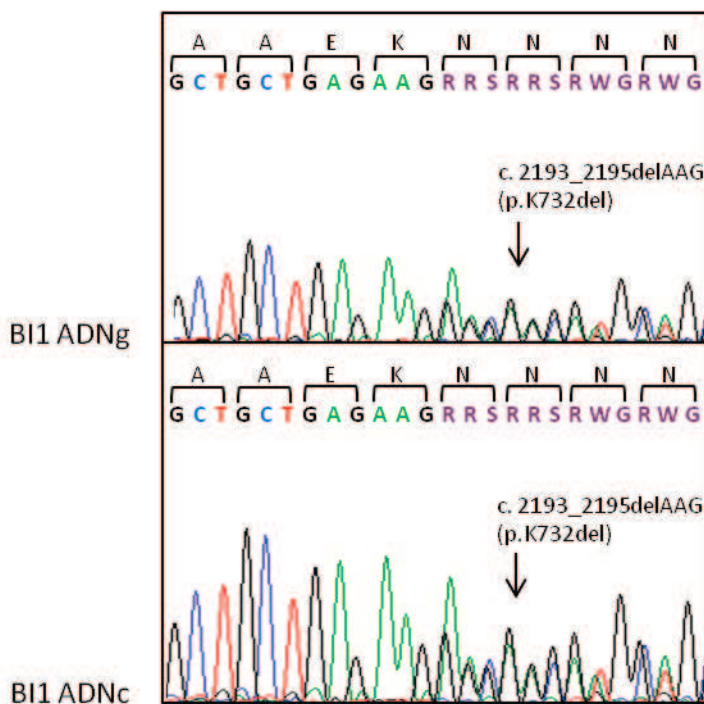


Figure 46 : Séquences de l'ADNg et de l'ADNc *NOX5* montrant la présence de la délétion p.K732del chez la patiente BI1.

La substitution c. 896C>T présente à l'état hétérozygote sur ADN génomique n'a pas été retrouvée sur l'ADNc du gène *NOX5* du patient TO1 (Figure 47). Ceci nous indique que cette mutation engendre une déstabilisation de l'ARNm. Afin de pouvoir amplifier et séquencer cet ARNm instable, nous avons par la suite traité les cellules du patient à la puromycine, qui permet

d'augmenter la stabilité d'une espèce d'ARN instable. Nous n'avons pas réussi à obtenir cette espèce d'ARNm, car nous n'obtenons après traitement à la puromycine toujours que l'ARNm sauvage (Figure 47).

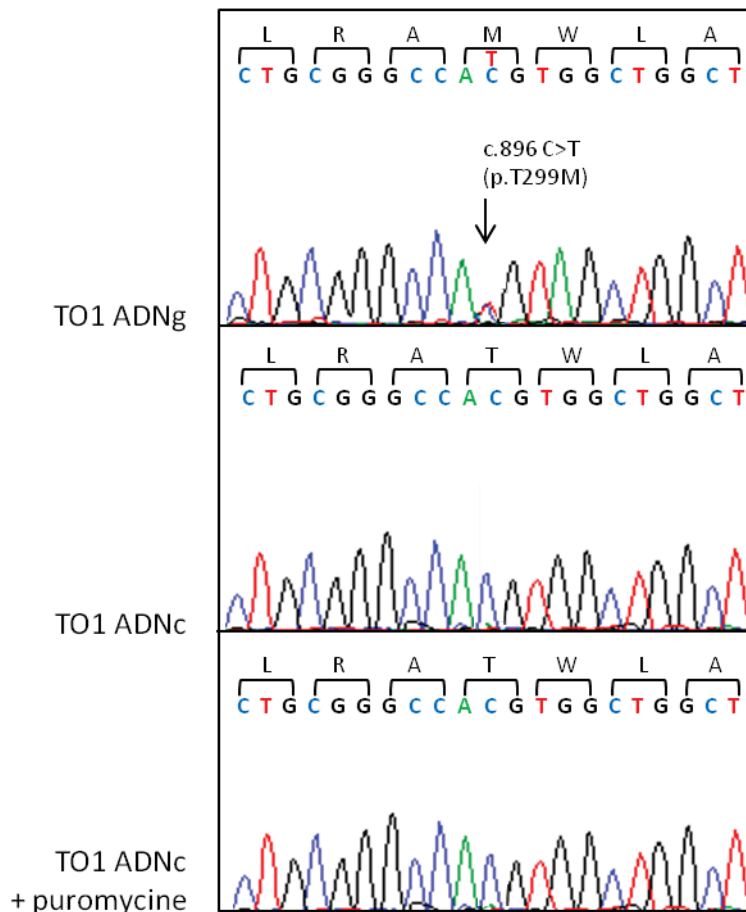


Figure 47 : Séquences de l'ADNg et de l'ADNc NOX5 montrant l'absence de la substitution p.T299M sur l'ADNc (normal et traité avec de la puromycine) du patient TO1.

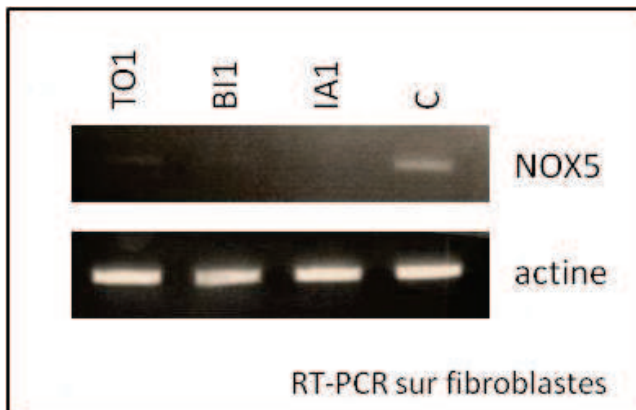
### 3. Expression du gène *NOX5*

#### a. Etude des transcrits

Afin d'étudier l'expression du gène *NOX5*, et déterminer si les deux allèles du gène montrent une diminution d'expression, nous avons voulu quantifier le transcrit *NOX5* par RT-PCR quantitative. Cependant, *NOX5* étant très faiblement exprimé dans les fibroblastes, nous n'avons pas pu réaliser cette quantification. Nous avons toutefois observé, grâce à une RT-PCR semi-quantitative, que la quantité de transcrit *NOX5* est très diminuée chez les trois patients mutés.



On estime l'abondance du transcrite NOX5 à 5% pour BI1 et 15% pour TO1 par rapport au contrôle, et absente chez la patiente IA1 (Figure 48).



**Figure 48 : Electrophorèse des produits de RT-PCR réalisée sur les ARN extraits de fibroblastes des patients TO1, BI1 et IA1 et d'un contrôle (C).**

*La quantité de transcrite NOX5 est fortement diminuée chez les patients IA1, TO1 et BI1.*

De plus, la patiente IA1 a bénéficié d'une étude de son transcriptome, et les résultats nous indiquent que le gène *NOX5* est très fortement sous-exprimé, avec un rapport de 0,02 par rapport au contrôle.

Nous allons ensuite déterminer les conséquences de la diminution de la quantité d'ARNm *NOX5* muté observée chez les trois patients sur l'abondance de la protéine.

## **b. Etude de la protéine**

Il n'existe pas de structure cristalline de la protéine *NOX5*, ni celle d'un orthologue, ce qui nous aurait permis de modéliser la protéine et analyser le retentissement de la mutation. Nous pouvons en un premier temps regarder quels sont les domaines fonctionnels impliqués par les mutations.

Les différentes mutations identifiées dans le gène *NOX5* sont localisées dans différents domaines de la protéine, à savoir le domaine Ferric réductase, constitué de six domaines transmembranaires dont deux permettent la liaison du fer, ainsi que dans des domaines conservés de liaison au FAD et au NAD (Figure 49).

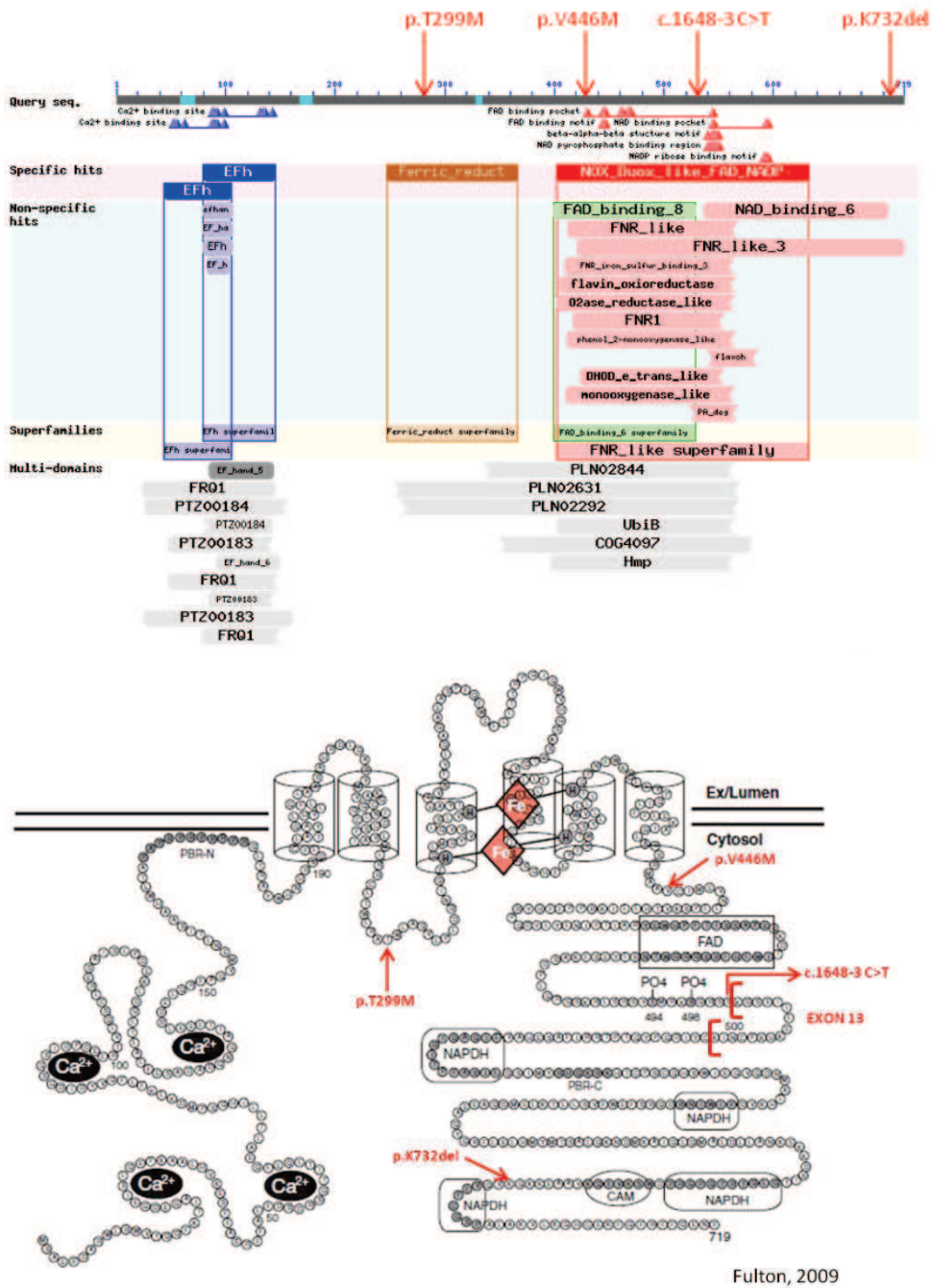


Figure 49 : Localisation des mutations identifiées dans le gène *NOX5*.

Haut : Représentation schématique des domaines conservés de la protéine (NCBI Conserved domains website).  
 Bas : Prédiction de la topologie de la protéine *NOX5* et de ses domaines fonctionnels. Les mutations sont indiquées en rouge.

Pour déterminer si ces différentes mutations pouvaient avoir une conséquence quantitative mais également qualitative sur la protéine *NOX5*, nous avons étudié la présence de la protéine sur des mitochondries extraites de fibroblastes des patients IA1, TO1 et BI1 par SDS-PAGE. Nous n'avons pas identifié d'anomalie qualitative, mais avons constaté une diminution très nette de la quantité de

la protéine, en accord avec la diminution d'abondance du transcrit. La quantité résiduelle de la protéine NOX5 est estimée à 11% 14% et 12% respectivement pour IA1, TO1 et BI1, par rapport au contrôle (Figure 50).

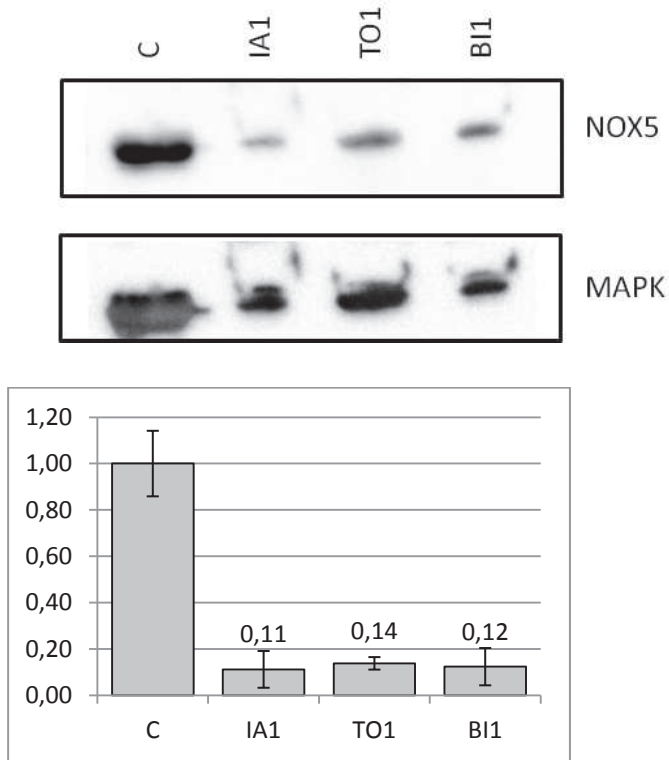


Figure 50 : SDS-PAGE montrant la présence de la protéine NOX5, réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes des patients IA1, TO1 et BI1.

#### 4. Recherche d'un deuxième événement de mutation

##### a. Hypothèses

Nous avons donc pour ces trois familles une mutation hétérozygote présente chez l'enfant atteint, transmise par un parent sain (Figure 51). Par conséquent, l'hypothèse d'une maladie dominante est exclue. Dans les trois cas, le séquençage du transcrit NOX5 à partir d'ARN de fibroblastes n'a révélé aucune anomalie d'épissage ou de remaniement majeur.

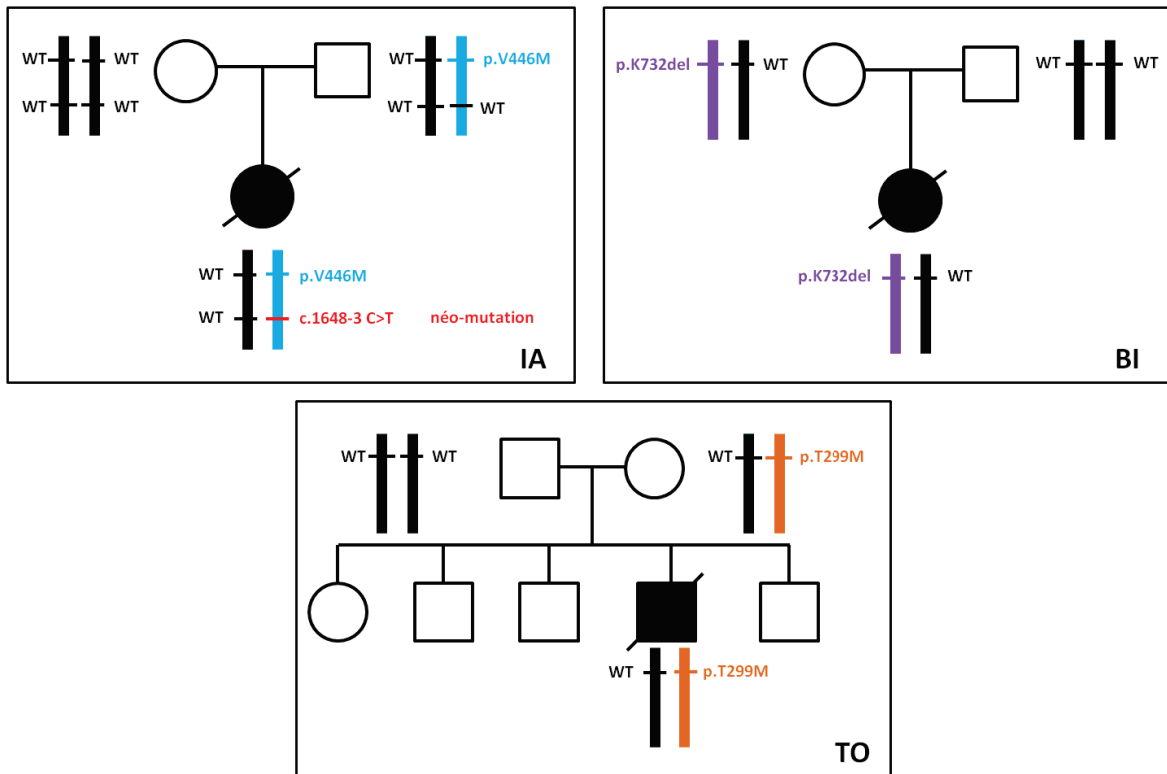


Figure 51 : Schéma récapitulatif des mutations identifiées dans le gène *NOX5* et de leur ségrégation dans les trois familles IA, BI et TO.

Les 2 barres verticales représentent les 2 allèles du locus *NOX5*. En couleur, l'allèle muté dans chaque famille.

Les différentes hypothèses quant à la nature de la seconde mutation sont les suivantes :

- phénomène d'empreinte génétique parentale
- mutation dans une séquence régulatrice de l'expression de *NOX5*
- mutation du promoteur ou du site de polyadénylation
- délétion ou insertion dans le gène *NOX5*

## b. Empreinte génétique parentale

L'expression d'un gène peut être régulée par des modifications épigénétiques (modifications qui n'affectent pas directement la séquence nucléotidique et sont transmises au cours des générations). La méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones sont des mécanismes épigénétiques à l'origine de l'empreinte génomique parentale. Par le mécanisme d'empreinte parentale, l'expression de certains gènes est réprimée pour un seul des deux allèles, en fonction de son origine parentale. Les gènes soumis à empreinte parentale ont donc un seul des deux allèles exprimé dans les cellules somatiques.

Bien qu'il existe une région soumise à empreinte sur le chromosome 15 en 15q11-q13, (et la délétion d'une partie de cette région est responsable du syndrome d'Angelman (délétion de l'allèle maternel) ou de Prader-Willi (délétion de l'allèle paternel)), le gène *NOX5* est situé en 15q23, en dehors de cette région. Nous avons cependant envisagé l'hypothèse que le gène *NOX5* soit soumis à empreinte parentale. En effet, il a été démontré qu'une méthylation du promoteur du gène *NOX5* plus importante chez des fœtus atteints d'un défaut septal ventriculaire (VSD Ventricular Septum Defect) par rapport à des fœtus contrôles était un mécanisme important d'inactivation de *NOX5*, pouvant être impliqué dans cette pathologie (Zhu, Yu et al. 2011).

Cependant, d'après le mécanisme d'empreinte génétique, lorsqu'une femme transmet à ses enfants un gène soumis à empreinte maternelle, ce dernier ne s'exprime chez aucun de ses enfants quelque soit leur sexe. Si ce gène est transmis par sa fille, il sera inactif chez tous les enfants de celle-ci, alors que s'il est transmis par son fils, il s'exprimera chez tous les enfants de ce dernier. Inversement, lorsqu'un homme transmet à ses enfants un gène soumis à empreinte paternelle, ce gène sera inactif chez ses enfants, fille ou garçon. Si le gène est transmis par son fils, il ne s'exprimera pas chez les descendants de celui-ci, s'il est transmis par sa fille, il sera actif chez tous les descendants de cette femme.

L'hypothèse que le gène *NOX5* est soumis à empreinte est exclue, étant donné que l'on a dans les trois familles différentes transmissions de l'allèle muté : père/fille, mère/fille, mère/fils.

Nous avons alors envisagé une à une les autres hypothèses citées plus haut pour identifier le deuxième événement mutationnel transmis par le parent non porteur de la première mutation.

### **c. Séquençage de CNE (Conserved Noncoding Elements)**

Les CNE (*Conserved Noncoding Elements*) sont des séquences non codantes hautement conservées au cours de l'évolution et ayant une fonction régulatrice de l'expression d'un gène. C'est généralement dans des gènes majeurs du développement, présentant des patrons d'expression complexes et souvent entourés d'un désert génique, que l'on trouve une concentration particulièrement riche en régions non codantes hautement conservées au cours de l'évolution. L'expression de ces gènes dans de nombreux territoires au cours du développement nécessite en effet une régulation coordonnée dans le temps et l'espace, orchestrée par certaines de ces régions conservées non codantes agissant comme des éléments

régulateurs de transcription. C'est le cas notamment d'éléments génomiques hautement conservés non codants trouvés à distance du gène *SOX9* (Benko, Gordon et al. 2011). En effet, *SOX9* est localisé dans un désert génique d'environ 2,5 Mb riche en séquences conservées.

Des variations du nombre de copies (CNV) localisées dans une région non codante située à plus de 1,2 Mb du promoteur de *SOX9* ont été associées à des anomalies du développement sexuel (DSD) de gravité variable. Cette région très en amont du promoteur contient des activateurs de transcription spécifiques des gonades, et il s'avère que le gain ou la perte de ces activateurs de transcription engendre un déséquilibre génomique suffisant pour activer ou inactiver l'expression de *SOX9* de manière tissu spécifique, dans les gonades, provoquant un DSD.

Nous avons grâce à des analyses de conservation entre espèces, sélectionné 159 CNE, d'une taille allant de 60 à 200 pb, localisés dans les régions introniques ainsi que dans les régions régulatrices 5'UTR et 3'UTR situées 1 kb de part et d'autre du gène *NOX5*. Leur pertinence est évaluée en fonction de leur degré de conservation au cours de l'évolution, mais aussi en tenant compte de leur sensibilité à la DNase I et/ou de leur contenu en sites de liaison de facteurs de transcription (TFBS). En effet, les sites hypersensibles à la DNase I caractérisent les bases particulièrement exposées au niveau d'un promoteur et qui sont impliquées dans les mécanismes de régulations transcriptionnelles.

Nous avons recherché une variation dans un CNE chez l'enfant atteint et le parent non porteur de la première mutation, qui soit à l'origine d'un allèle hypomorphe, à savoir un allèle qui permet l'expression du produit du gène, dont la protéine conserve la même fonction que le produit sauvage, mais en quantité plus faible.

Le séquençage de ces 159 CNE a mis en évidence, chez les individus atteints des trois familles, la présence de variations homozygotes ou hétérozygotes dans 13 CNE. Aucune variation n'est commune aux trois patients. Nous avons regardé la ségrégation de ces variations dans chaque famille. Seule une variation identifiée dans le CNE102592 ségrége entre l'enfant BI1 et son parent non porteur de la première mutation (père BI).

La vérification du taux de transcrit *NOX5* dans les fibroblastes des individus n'a pas permis de confirmer l'effet de la variation ci-dessus. Le transcrit *NOX5* du patient BI1 porteur de la variation n'est pas sous-exprimé par rapport au transcrit de ses parents (Figure 52).

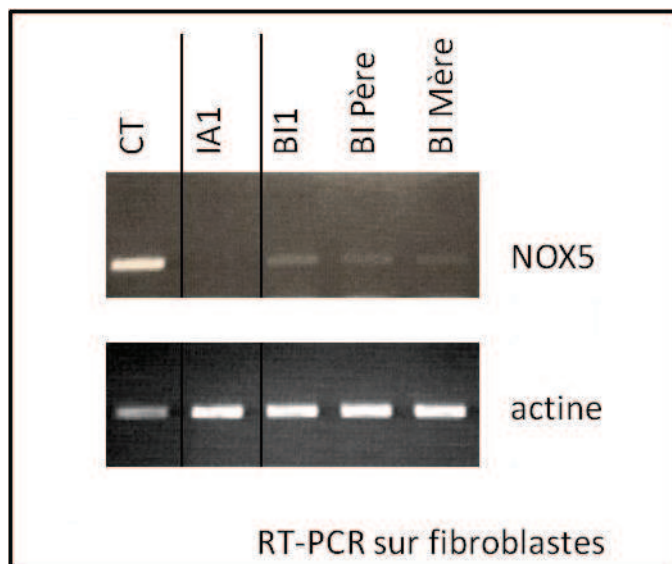


Figure 52 : Electrophorèse des produits de RT-PCR *NOX5* réalisée sur les ARN extraits de fibroblastes des patients IA1, BI1, BI père et BI mère et d'un contrôle (C).

Les variations n'engendrent donc pas la présence d'un allèle hypomorphe sous-exprimé. Ce ne sont donc probablement pas des mutations. Afin de trouver un deuxième événement de mutation, nous nous orientons donc vers d'autres hypothèses.

#### d. Séquençage des régions promotrice et de polyadénylation

N'ayant pas identifié de mutations dans les CNE localisés dans les séquences non codantes du gène *NOX5*, nous avons décidé de séquencer les régions promotrices ainsi que la région de polyadénylation de *NOX5*.

Comme le promoteur de *NOX5* n'est pas connu, nous avons recherché des séquences promotrices et des sites de fixation aux facteurs de transcription, sur 100 Kb en amont et en aval du gène *NOX5*. Nous avons pour cela recoupé les prédictions données par les logiciels de prédiction suivants : Neural Network Promoter Prediction, Proscan, Promoser, TSSG, NSITE. Chaque programme utilise des algorithmes et des critères différents afin de prédire les promoteurs et sites de fixation de facteurs de transcription. Pour chaque prédiction, la position du promoteur est donnée, ainsi qu'un score ou une probabilité (en fonction des algorithmes), et l'éventuelle position par rapport à ce promoteur d'une boîte TATA (fixation de l'ARN polymérase) et de facteurs impliqués dans la transcription.

Nous avons de même recherché des prédictions concernant le site de polyadénylation de *NOX5*. Nous avons combiné les résultats donnés par les logiciels POLYAH et Poly(A) Signal Miner.

Chaque algorithme fournit entre 15 et une centaine de prédictions. Nous avons recoupé ces résultats et choisi les séquences prédites par plusieurs logiciels à la fois et ayant les plus forts scores de prédiction. Nous avons sélectionné et séquencé 21 régions, d'une taille moyenne de 200 pb, chez les trois patients IA1, BI1 et TO1 ainsi que leurs parents.

19 substitutions nucléotidiques ont été identifiées dans 9 régions. Nous recherchons une variation chez l'enfant atteint et le parent non porteur de la première mutation. Malheureusement, toutes les variations identifiées étaient partagées par tous les membres de la famille.

Nous émettons par la suite l'hypothèse que la deuxième mutation soit un grand remaniement, non détecté par PCR, qui ne soit pas localisé dans la séquence codante du gène puisque l'ARN des patients ne montre pas d'anomalie qualitative.

### **e. Etude par CGH array enrichie**

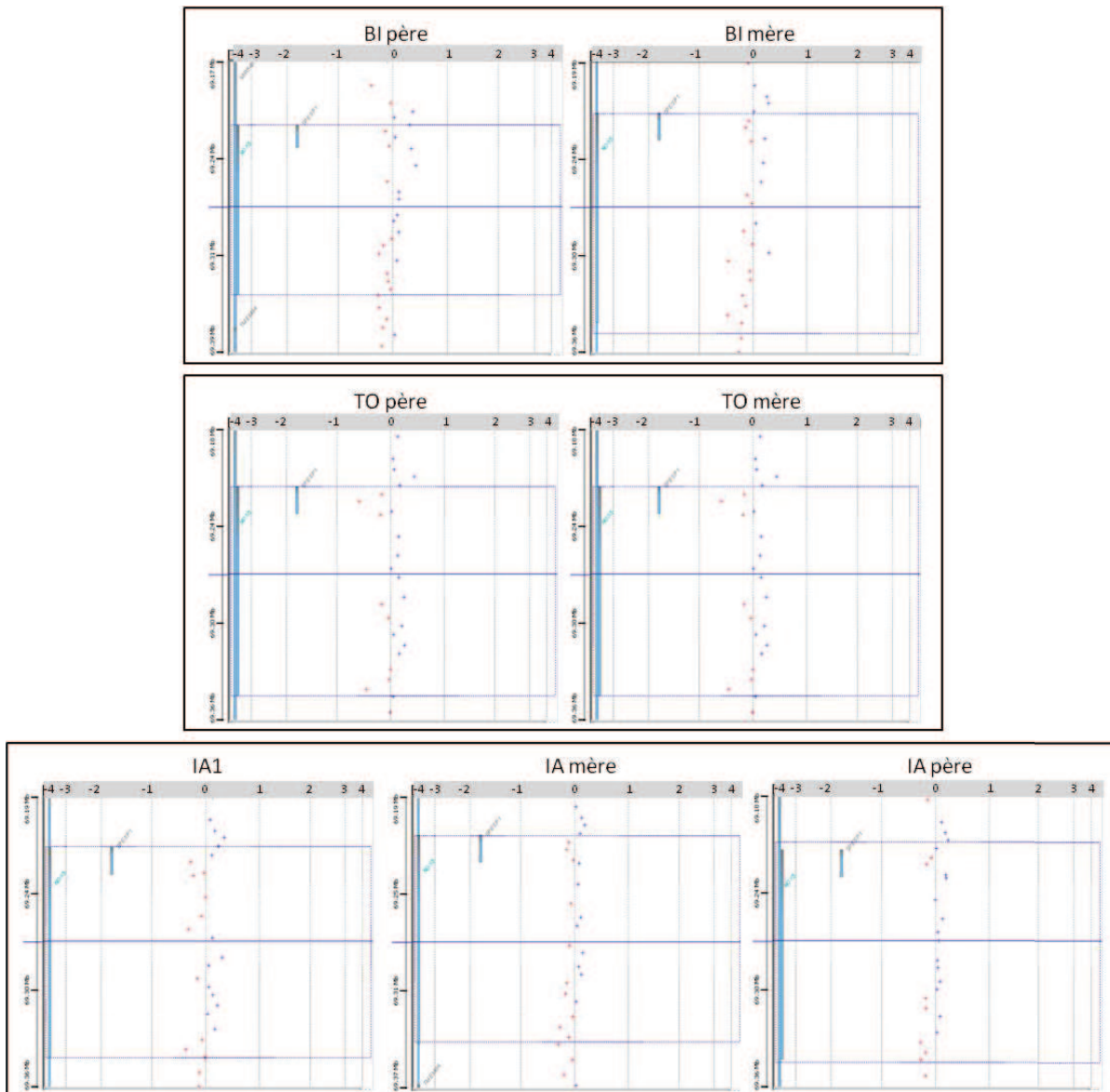
D'éventuels remaniements (délétions, duplications, insertions) non visibles en PCR et séquençage Sanger ont été recherchés par CGH array (*Comparative Genomic Hybridization array*).

Nous avons utilisé une puce pangénomique Agilent 244K, dont le seuil de détection d'une anomalie sur l'ensemble du génome est de 10 Kb.

L'ADN analysé par CGH array doit être de très bonne qualité et non contaminé par des ARN. L'idéal est de disposer d'ADN leucocytaire car l'ADN extrait de fibroblastes est souvent contaminé par des ARN. Pour les patients BI1 et TO1, nous disposons seulement d'ADN extrait de fibroblastes en culture de qualité insuffisante. Nous avons donc décidé d'étudier l'ADN leucocytaire des parents BI père, BI mère, TO père et TO mère. En revanche, nous avons de l'ADN leucocytaire de tous les membres de la famille IA (IA1, IA père et IA mère), sur lesquels a été réalisée la CGH array.

Aucun réarrangement, duplication ou délétion dans la région de *NOX5* n'a été détecté pour les individus testés avec cette puce d'hybridation (Figure 53). De plus, aucun autre réarrangement sur l'ensemble du génome n'a été mis en évidence.



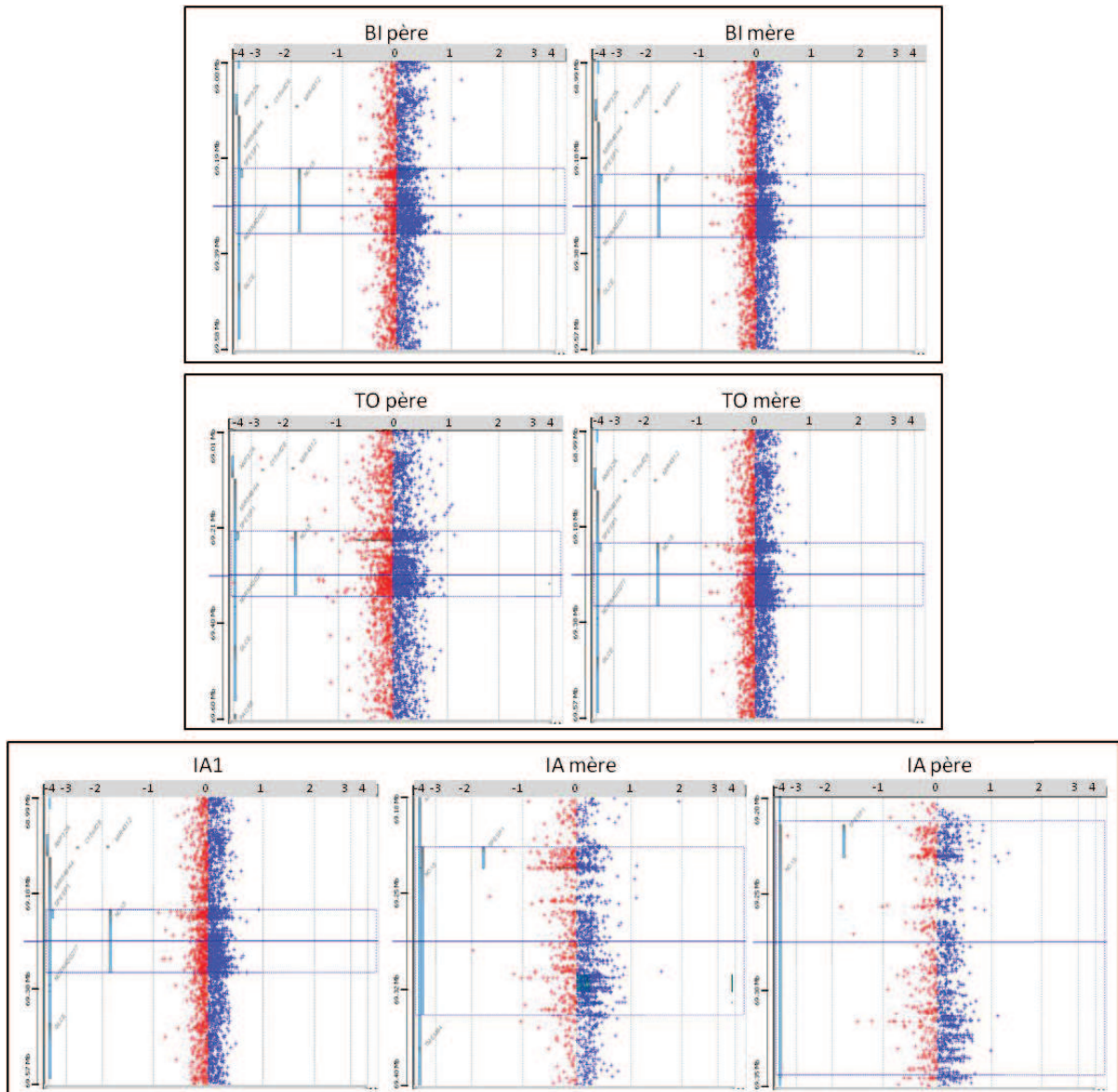


**Figure 53 : Profil de la CGH array 244K pour la région génomique du gène *NOX5* pour les individus BI père, BI mère, TO père, TO mère, IA1, IA mère, IA père.**

*L'axe y indique la position génomique en Mb sur le chromosome 15. L'axe x indique le log2 du ratio d'hybridation entre le patient et le contrôle calculé pour chaque oligonucléotide. Chaque oligonucléotide est représenté par un point. Le marquage du patient est représenté en rouge, le marquage du contrôle en bleu.*

Une deuxième puce Agilent 180K a été ensuite utilisée. Cette puce a été customisée afin de l'enrichir en oligonucléotides spécifiquement dans la région génomique comprenant le gène *NOX5* ainsi que les régions non traduites en 5' et 3' situées 1 Mb en amont et en aval du gène *NOX5*. Les oligonucléotides utilisés sont des 60-80 mers. La résolution de la puce Agilent 180K est de 15 à 30 kb et l'enrichissement spécifique permet une résolution bien plus fine, à savoir de 100 pb, de la région que nous avons ciblée.

Les contraintes sur la qualité de l'ADN étant les mêmes que pour la puce CGH 244K, les mêmes ADN ont été utilisés ici. Aucun déséquilibre génomique n'a été mis en évidence par cette puce d'hybridation (Figure 54).



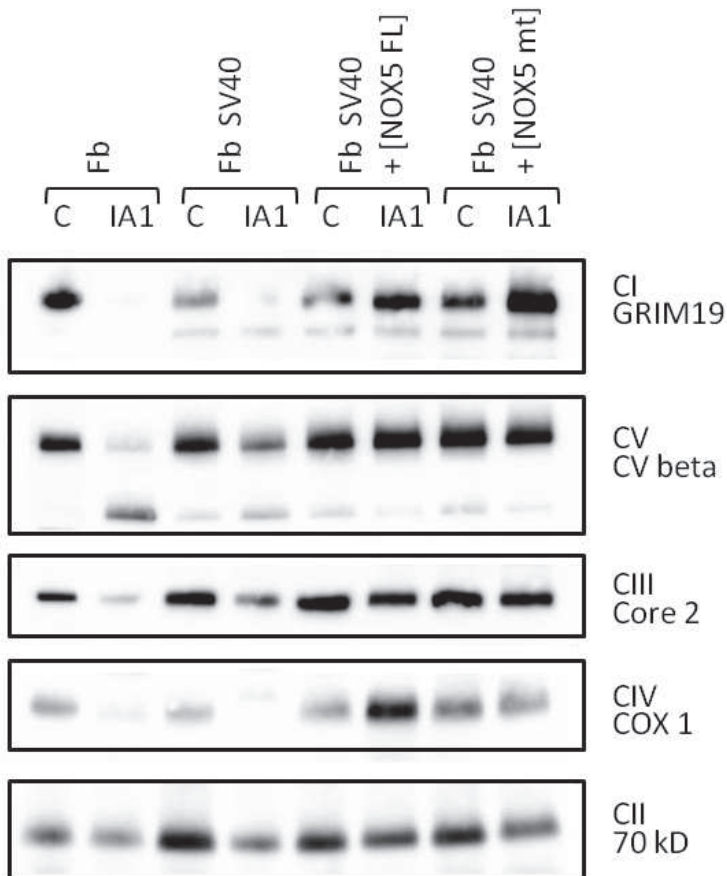
**Figure 54 : Profil de la CGH array 180K custom pour la région génomique du gène *NOX5* pour les individus BI père, BI mère, TO père, TO mère, IA1, IA mère, IA père.**

*L'axe y indique la position génomique en Mb sur le chromosome 15. L'axe x indique le  $\log_2$  du ratio d'hybridation entre le patient et le contrôle calculé pour chaque oligonucléotide. Chaque oligonucléotide est représenté par un point. Le marquage du patient est représenté en rouge, le marquage du contrôle en bleu.*

Il est important de noter que cette approche ne permet pas de détecter les remaniements chromosomiques équilibrés.

## 5. Validation de la mutation par sauvetage phénotypique

En parallèle de la recherche des deuxièmes mutations, nous avons décidé de valider la première mutation chez la patiente IA1, pour laquelle les fibroblastes expriment un phénotype, à savoir un défaut d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire. Nous avons donc surexprimé la protéine NOX5 sauvage dans les fibroblastes de la patiente IA1 préalablement immortalisés par l'antigène T de SV40.



**Figure 55** : BN-PAGE réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes (Fb), de fibroblastes immortalisés par l'antigène T de SV40 (Fb SV40) et de fibroblastes SV40 transfectés par le vecteur d'expression pCDNA3.1A contenant l'ADNc sauvage de NOX5 entier (NOX5 FL) ou l'ADNc de NOX5 forme mitochondriale (NOX5 mt).

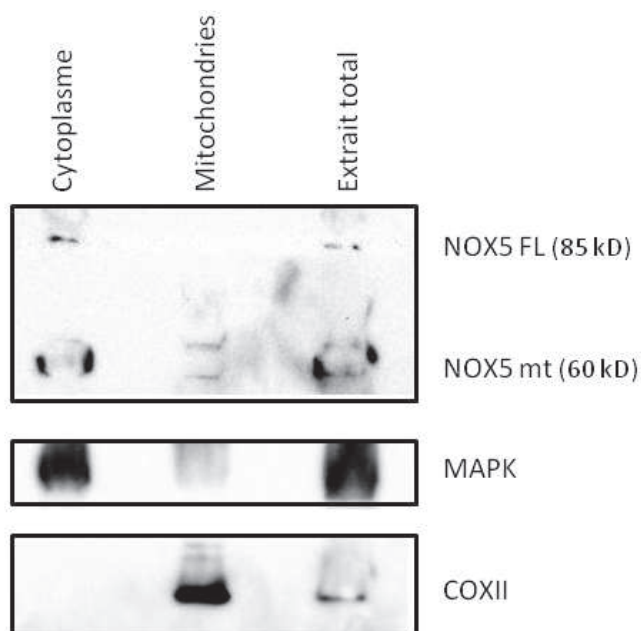
*Les quantités des complexes I, III, IV et V sont diminuées dans les fibroblastes du patient IA1 par rapport au contrôle (C) et leur immortalisation ne modifie pas ce phénotype. La sur-expression de l'ADNc [NOX5 FL] ou [NOX5 mt] rétablit un assemblage normal des complexes I, III, IV et V.*

L'immortalisation des fibroblastes IA1 par l'antigène T de SV40 n'a pas altéré le phénotype d'assemblage de la chaîne respiratoire. L'ADNc NOX5 de taille entière (FL) ou la forme mitochondriale (mt) permet dans les deux cas de restaurer un assemblage normal des complexes I, III, IV et V.

## 6. Etude fonctionnelle de la protéine NOX5

### a. Localisation mitochondriale de la protéine NOX5

Nous avons vu que l'isoforme NOX5 $\epsilon$  de la protéine NOX5 est prédite pour avoir un adressage mitochondrial. Nous avons voulu vérifier ces prédictions de localisation de la protéine NOX5 par fractionnement cellulaire. La Figure 56 nous montre que les deux formes NOX5mt et NOX5FL sont présentes dans le cytoplasme, ainsi que dans la fraction de protéines totales. On vérifie que la fraction de mitochondries est bien enrichie en COXII, protéine exclusivement présente dans les mitochondries. La pureté de la fraction de mitochondries est vérifiée par l'enrichissement en protéine mitochondriale COXII et par l'absence de la protéine MAPK. Celle de la fraction cytosolique est vérifiée par l'absence de la protéine COXII. On observe d'après cette expérience que seulement la forme mitochondriale de la protéine NOX5 est présente dans la fraction purifiée de mitochondries. La présence de deux bandes pour la fraction mitochondriale peut être compatible avec la détection des deux formes de la protéine avec et sans pré-séquence d'adressage à la mitochondrie. En effet, la pré-séquence d'adressage mitochondrial est prédite pour faire 71 acides aminés.

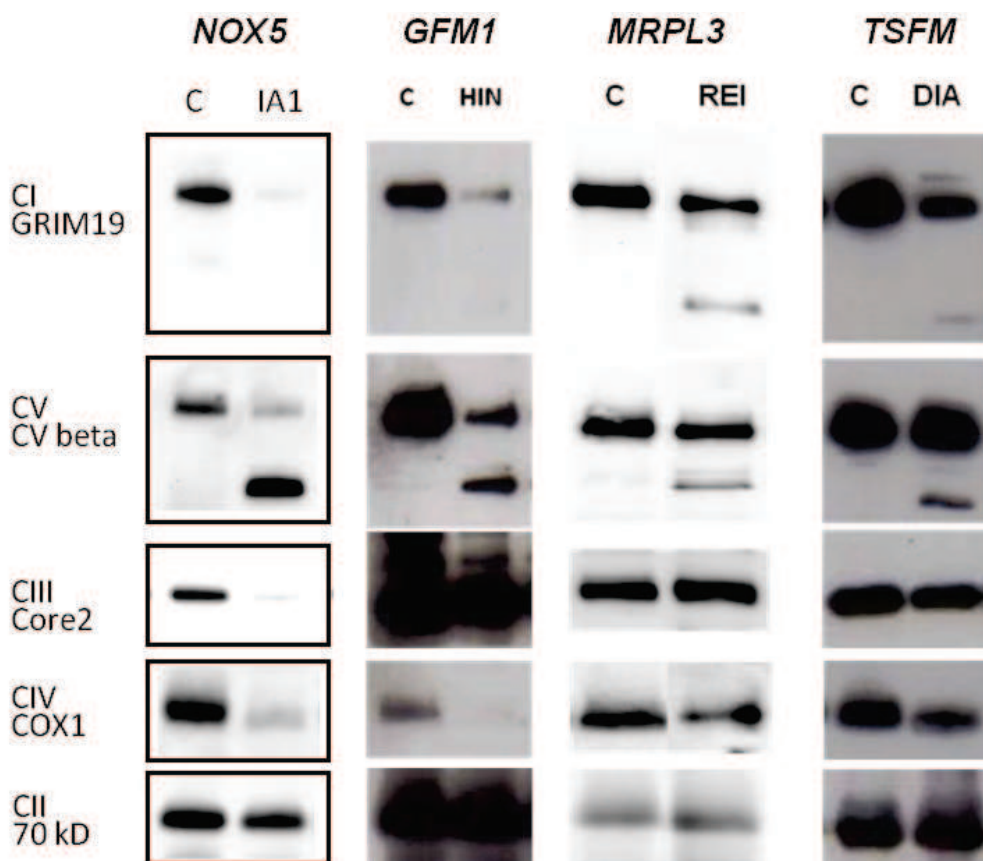


**Figure 56 : SDS-PAGE montrant la localisation cellulaire de NOX5, réalisé sur des fractions cellulaires (cytoplasme, mitochondries, extrait total de protéines) de fibroblastes contrôles.**

*Les deux formes (mt et FL) de la protéine NOX5 sont présentes dans le cytoplasme, et dans l'extrait de protéines totales. La pureté de la fraction de mitochondries est vérifiée par l'absence de la protéine MAPK et celle de la fraction cytosolique par l'absence de la protéine COXII. On observe que la fraction de mitochondries présente uniquement la forme NOX5mt.*

**b. NOX5, acteur de la traduction mitochondriale ?**

L'anomalie d'assemblage de l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire contenant des protéines codées par le génome mitochondrial (complexes I, III, IV et V) détectée par BN-PAGE est très évocatrice d'une anomalie de la traduction mitochondriale. En effet, ce profil est très semblable à ceux que nous avons observés dans des fibroblastes de patients mutés pour *GFM1*, *TSMF*, ou *MRPL3*. Pour tous ces patients, le BN-PAGE révèle un défaut quantitatif des complexes I, III, IV et V assemblés par rapport au contrôle ainsi qu'un défaut qualitatif du complexe V avec la présence d'un sous-complexe de plus bas poids moléculaire. Les patients HIN, REI et DIA présentent en plus un défaut qualitatif du complexe I, ce qui n'est pas détecté pour la patiente IA1 étant donné que le complexe I est quasi inexistant chez ce patient (Figure 57). Ces résultats suggèrent que la protéine NOX5, dont la fonction est inconnue, pourrait avoir un rôle dans la traduction mitochondriale.

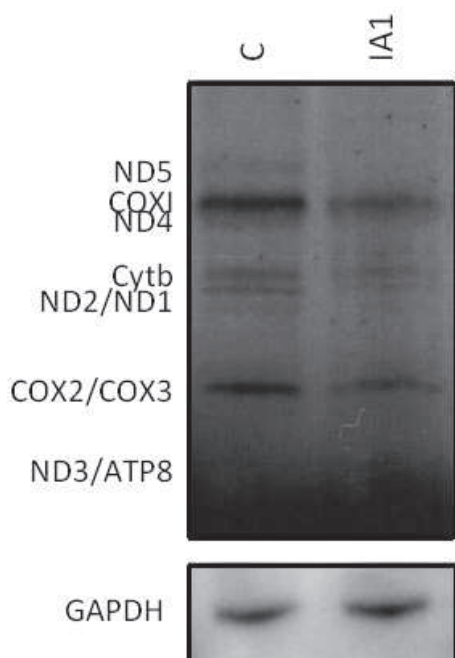


**Figure 57 : BN-PAGE réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes des patients mutés dans les gènes *GFM1*, *MRPL3* et *TSMF* comparé au BN-PAGE de la patiente IA1.**

Les quantités des complexes I, III, IV et V sont diminuées et un -CV beta chez l'ensemble des patients par rapport au contrôle. Un sous-complexe de plus bas poids moléculaire est révélé par l'anticorps anti-GRIM19 chez les patients HIN, REI et DIA.



La traduction mitochondriale de la patiente IA1 a été étudiée *in vitro* par marquage radioactif avec de la méthionine marquée au  $^{35}\text{S}$ . On observe une diminution de la quantité de l'ensemble des protéines mitochondriales traduites chez la patiente IA1, confirmant les résultats du BN-PAGE (Figure 58).



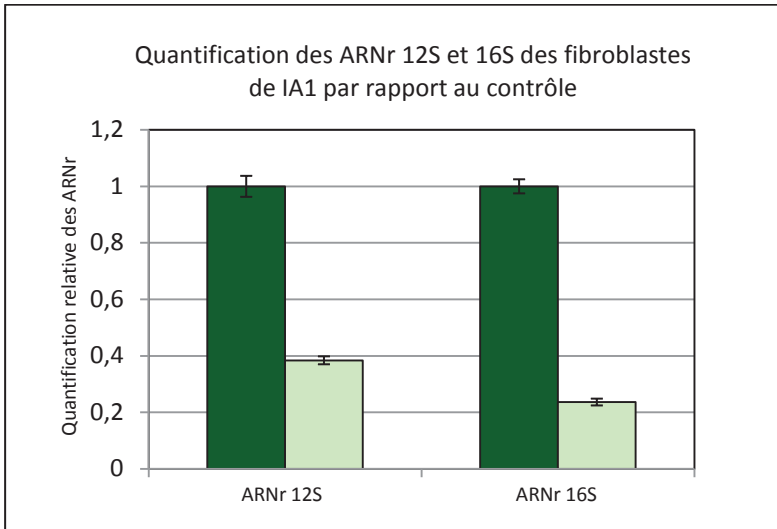
**Figure 58 :** Etude de la traduction *in vitro* par marquage à la méthionine  $^{35}\text{S}$  des protéines codées par l'ADNmt sur des fibroblastes du patient IA1 et d'un contrôleur.

*On observe une diminution de la traduction de l'ensemble des protéines codées par l'ADNmt pour la patiente IA1 par rapport au contrôleur.*

L'ensemble de ces résultats est compatible avec l'hypothèse d'une anomalie de la traduction des protéines mitochondriales pour la patiente IA1.

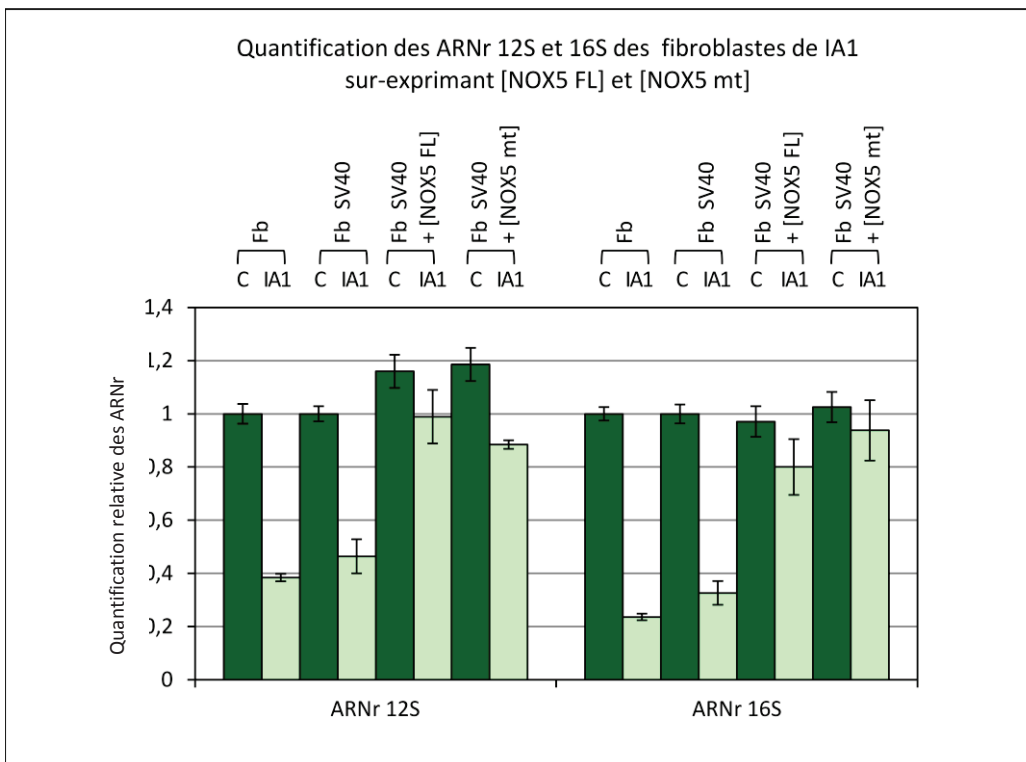
### c. Impact des mutations NOX5 sur le ribosome mitochondrial

Afin d'investiguer le lien entre NOX5 et la machinerie de traduction mitochondriale, nous avons tout d'abord étudié l'assemblage du ribosome mitochondrial dans les fibroblastes de la patiente IA1. Nous avons tout d'abord quantifié les ARN ribosomiaux mitochondriaux 12S et 16S par RT-PCR quantitative. Les quantités d'ARNr 12S et d'ARNr 16S sont respectivement de 40% et de 25% par rapport à celles d'un contrôleur (Figure 59).



**Figure 59 :** Quantification par qPCR des ARNr mitochondriaux 12S et 16S pour la patiente IA1 (vert clair) par rapport à un contrôle C (vert foncé).

La quantité des ARNr 12S et 16S est diminuée chez la patiente IA1, puisqu'on quantifie 40% d'ARNr 12S et 25% d'ARNr 16S chez IA1 par rapport au contrôle.

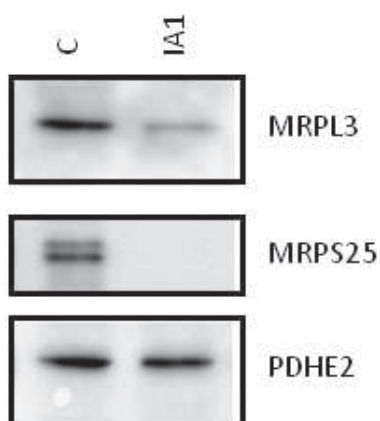


**Figure 60 :** Quantification par qPCR des ARNr mitochondriaux 12S et 16S des fibroblastes de la patiente IA1 transfectés par le vecteur d'expression pCDNA3.1 contenant [NOX5FL] ou [NOX5mt], par rapport à un contrôle C.

La quantité des ARNr 12S et 16S est diminuée chez la patiente IA1 par rapport au contrôle. On observe le retour d'une quantité d'ARNr 12S normale chez les fibroblastes IA1 + [NOX5FL] (99%) ou + [NOX5mt] (88%), de même pour l'ARNr 16S chez les fibroblastes IA1 + [NOX5FL] (97%) et + [NOX5m] (94%).

La quantification par qPCR des ARNr mitochondriaux 12S et 16S a été également réalisée dans les fibroblastes de IA1 sur-exprimant [NOX5FL] ou [NOX5mt]. On observe une restauration des taux de transcrits des ARNr 12S et 16S dans les fibroblastes IA1 transfectés avec l'ADNc NOX5FL et NOX5mt (Figure 60).

Nous avons également étudié par SDS-PAGE la présence d'une protéine de la grande sous-unité ribosomale MRPL3 et celle d'une protéine de la petite sous-unité ribosomale MRPS25 dans les fibroblastes du patient IA1. Nous constatons une diminution très nette de la quantité de la protéine MRPL3, et une présence quasi nulle de la protéine MRPS25 (Figure 61).



**Figure 61 : SDS-PAGE montrant la présence des protéines ribosomales MRPL3 et MRPS25, réalisé sur les mitoplastes extraits de fibroblastes de IA1 et d'un contrôle.**

*La quantité de la protéine MRPL3 est fortement diminuée et la protéine MRPS25 est absente chez IA1 par rapport au contrôle. PDHE2, protéine de la membrane interne mitochondriale, sert de témoin de dépôt.*

La diminution de la quantité des ARNr 12S et 16S et la diminution de la quantité de protéines ribosomales appartenant aux deux sous-unités 12S et 16S du ribosome mitochondrial chez l'individu IA1 muté dans le gène *NOX5* sont des arguments en faveur d'une implication de la protéine *NOX5* dans l'assemblage de la petite et la grande sous-unité du mitoribosome et démontrent donc un lien entre *NOX5* et la synthèse des protéines codées par l'ADNmt.



## 7. Conclusion

Cette étude nous a permis d'identifier un nouveau gène d'atteinte hépatique mitochondriale chez des patients de trois familles indépendantes.

Pour la patiente IA1, nous avons identifié deux mutations hétérozygotes en cis : une substitution dans l'exon 10 de la Valine 446 par une Méthionine (acide aminé peu conservé entre les espèces mais très conservé au sein de la famille des protéines NOX), héritée du père, ainsi qu'une néo-mutation c.1648-3 C>T trois nucléotides avant le début de l'exon 13. Une délétion hétérozygote de la Lysine 732 dans l'exon 18 (acide aminé très conservé entre les espèces) transmise par la mère et prédite comme étant délétère, a été identifiée chez la patiente BI1. Enfin, nous avons identifié chez le patient TO1 une substitution de la Thréonine 299 (acide aminé très conservé parmi les orthologues de NOX5) par une Méthionine dans l'exon 8, héritée de sa mère et prédite également comme étant délétère pour la protéine. Ces mutations sont localisées dans différents domaines protéiques de NOX5 : la mutation T299M est située dans le domaine transmembranaire Ferric réductase de NOX5 comprenant six régions transmembranaires conservées dont deux sont nécessaires à la liaison du fer. La mutation p.V446M et l'exon 13 en aval de la mutation c.1648-3 C>T sont localisés en aval de cette région transmembranaire, dans le domaine conservé de liaison au FAD, la délétion p.K732del est située dans le domaine de liaison au NAD en C terminal.

Ces mutations ont un impact sur l'expression du gène *NOX5*, puisque nous avons vérifié par RT-PCR (et grâce au transcriptome pour la patiente IA1) que le taux de transcrit *NOX5* était diminué chez les trois patients à plus de 50%. L'allèle muté du patient TO1 n'est pas stable ou doit être dégradé, puisque nous ne réussissons à amplifier que le transcrit et donc l'allèle sauvage. De plus, l'allèle ne portant pas les deux mutations pour la patiente IA1 est également sous-exprimé. En accord avec la diminution du transcrit, la quantité de la protéine est également très fortement diminuée chez les trois patients. La diminution de la quantité de transcrit et de la protéine de plus de 50% chez les trois patients sont des éléments qui nous ont confirmé dans notre idée que le deuxième allèle porte également une mutation provoquant une baisse d'expression.

Afin de déterminer la fonction de *NOX5* qui n'était jusqu'à présent pas connue, nous avons tout d'abord vérifié par fractionnement cellulaire, que l'isoforme s la plus courte de *NOX5* était bien localisée dans la mitochondrie, en plus de sa localisation cytosolique.

Nous sommes ensuite partis de l'observation des phénotypes des patients mutés. Sur les trois patients, seul la patiente IA1 présente un phénotype cellulaire sur fibroblastes, c'est pourquoi nous avons concentré l'étude fonctionnelle des mutations de *NOX5* sur ce patient.

La patiente IA1 présente une anomalie de l'assemblage de la chaîne respiratoire similaire à celle observée dans le cas de mutations dans les gènes *GFM1* (Galmiche, Serre et al. 2012), *MRPL3* (Galmiche, Serre et al. 2011) ou *TSFM* (Vedrenne, Galmiche et al. 2012). De plus, on observe un déficit de la traduction de l'ensemble des protéines mitochondriales, par marquage à la Met<sup>[35S]</sup>. Nous rappelons que nous avons mis en évidence, grâce au transcriptome, un sous-groupe de six patients suspectés d'avoir une anomalie de traduction. Parmi ces six patients, le patient 10 (qui nous le rappelons est la patiente IA1) montrait les résultats les plus probants en traduction *in vitro*. Enfin, la quantité des ARNr 12S et 16S est diminuée et nous avons observé une diminution de la quantité des protéines ribosomales MRPS25 et MRPL3, appartenant respectivement aux deux sous-unités 12S et 16S du ribosome mitochondrial, suggérant un assemblage anormal du mitoribosome. L'ensemble de ces éléments nous amènent à penser que la protéine NOX5 est impliquée dans la synthèse des protéines codées par l'ADNmt.

Il nous reste cependant à identifier pour les trois patients les deuxièmes mutations de *NOX5*, que nous n'avons pu mettre en évidence par séquençage exome, séquençage Sanger des CNE, CGH array customisée ou encore séquençage Sanger des régions promotrices et régulatrices putatives de la transcription. Nous sommes cependant convaincus que *NOX5* est bien le gène responsable de la maladie, puisque la sur-expression de l'ADNc sauvage de *NOX5* restaure un phénotype normal dans les fibroblastes de la patiente IA1. De plus, chez les trois patients, l'allèle apparemment normal est sous-exprimé, suggérant que cet allèle porte une mutation affectant son niveau d'expression. Nous prévoyons donc d'effectuer le séquençage complet de la région génomique de *NOX5* pour les trois individus atteints et également de rechercher la présence d'une translocation équilibrée, notamment par peignage moléculaire.

Enfin, nous envisageons de déterminer précisément le rôle de *NOX5* dans la traduction mitochondriale et compléter les données préliminaires suggérant un assemblage anormal du mitoribosome par l'étude directe de l'assemblage du ribosome mitochondrial en étudiant le profil des sous-unités 28S et 39S par gradient de densité de sucrose. Nous envisageons également de rechercher d'éventuels partenaires de *NOX5* par double hybride.

## VI. ANOMALIES DE TRADUCTION MITOCHONDRIALE

Mis à part les ARNt et ARNr, toutes les protéines et facteurs protéiques nécessaires à la traduction mitochondriale sont codés par le génome nucléaire. Des mutations dans des gènes nucléaires impliqués dans la traduction mitochondriale sont responsables d'atteintes phénotypiques très variables.

Par différentes approches combinant l'étude de l'assemblage de la chaîne respiratoire, la cartographie génétique dans des familles multiplex et/ou consanguines, l'étude de gènes candidats et le séquençage haut débit, nous avons également identifié des mutations dans différents gènes nucléaires impliqués dans la traduction mitochondriale. Nous rapportons ici ces différentes mutations.

### 1. Mutations du gène *GFM1*

Le gène *GFM1*, codant pour un des 3 facteurs d'élongation de la traduction mitochondriale, est un exemple de variabilité phénotypique puisque les mutations de *GFM1* peuvent être responsables d'atteintes hépatiques mitochondriales ou d'encéphalopathies.

Nous nous sommes intéressés à ce gène chez un enfant présentant une encéphalopathie sévère néonatale, issus de parents consanguins, pour lequel nous avons réalisé une étude de cartographie par homozygotie.

Ces résultats font l'objet d'un article publié dans Mitochondrion présenté dans les pages suivantes.

### 2. Mutations du gène *MRPL3*

Le mitoribosome contient 80 protéines. Seules des mutations dans les gènes *MRPS16* (Miller, Saada et al. 2004), *MRPS22* (Saada, Shaag et al. 2007) et *MRPL44* (Carroll, Isohanni et al. 2013) ont été décrites à ce jour.

Nous avons identifié des mutations dans le gène *MRPL3* chez quatre enfants d'une même famille atteints d'une cardiomyopathie et d'un retard psychomoteur, et présentant un déficit généralisé de l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

Ces résultats font l'objet d'un article publié dans Human Mutation présenté dans les pages suivantes.



Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

## Mitochondrion

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mito](http://www.elsevier.com/locate/mito)Toward genotype phenotype correlations in *GFM1* mutations

Louise Galmiche, Valérie Serre, Marine Beinat, Raïssa Zossou, Zahra Assouline, Anne-Sophie Lebre, Florence Chretien, Ruthie Shenhav, Avraham Zeharia, Ann Saada, Vanessa Vedrenne, Nathalie Boddart, Pascale de Lonlay, Marlène Rio, Arnold Munnich, Agnès Rötig\*

Department of Genetics, Hôpital Necker-Enfants Malades, Université Paris Descartes and INSERM U781, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France

Rabin Medical Center, Beilinson Campus, 49100 Petah Tikva, Israel

Day Hospitalization Unit, Schneider Children's Medical Center of Israel, Sackler Faculty of Medicine, Tel-Aviv University, Israel

Department of Genetics and Metabolic Diseases, Hadassah-Hebrew University Medical Center, 12000 Jerusalem 91120 Israel

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 14 April 2011

received in revised form 7 September 2011

accepted 16 September 2011

Available online xxx

## Keywords:

mitochondrial translation  
hepatic failure  
encephalopathy  
*GFM1* translation  
elongation factor

## ABSTRACT

Multiple respiratory chain deficiencies represent a common cause of mitochondrial diseases. We report two novel *GFM1* mutations in two unrelated patients with encephalopathy and liver failure respectively. The first patient had intrauterine growth retardation, seizures, encephalopathy and developmental delay. Brain MRI showed hypoplasia of the vermis and severe pontine atrophy of the brainstem that were similar to those reported in patients with mitochondrial translation deficiencies. The second patient had liver failure with hypoglycemia. Respiratory chain analysis showed a complex IV deficiency in muscle of both patients. A 10K SNP genotyping detected several regions of homozygosity in the two patients. In vitro translation deficiency prompted us to study genes involved in mitochondrial translation. Therefore, we sequenced the *GFM1* gene, encoding the mitochondrial translation factor EFG1, included in a shared homozygous region and identified two different homozygous mutations (R671C and L398P). Modeling studies of EFG1 protein suggested that the R671C mutation disrupts an inter-subunit interface and could locally destabilize the mutant protein. The second mutation (L398P) disrupted the H-bond network in a rich-beta-sheet domain, and may have a dramatic effect on local structure. *GFM1* mutations have been seldom reported and are associated with different clinical presentation. By modeling the structure of the protein and the position of the various mutations we suggest that the clinical phenotypes of the patients could be related to the localization of the mutations.

© 2011 Elsevier B.V. and Mitochondria Research Society. All rights reserved.

## 1. Introduction

Multiple respiratory chain (RC) deficiency represents a common cause of mitochondrial dysfunction, currently ascribed to abnormal mitochondrial DNA (mtDNA) maintenance (Spinazzola & Zeviani, 2007), defective cardiolipin biosynthesis (Houtkooper et al., 2009) and translation deficiency (Jacobs & Turnbull, 2005). The mitochondrial translation machinery consists of over a hundred different proteins that all represent putative candidate genes for translation deficiencies in human. Translation deficiencies are genetically heterogeneous and include mutations in i) mitochondrial ribosomal and transfer RNA genes (Ruiz-Pesini et al., 2007) and in nuclear genes encoding ii) mitochondrial ribosomal proteins (Miller et al., 2004; Saada et al., 2007), iii) tRNA modifying enzymes (Bykhovskaya et al., 2004; Zeharia et al., 2009), iv) aminoacyl tRNA synthetases

(Edvardson et al., 2007; Riley et al., 2010; Scheper et al., 2007) v) and translation elongation factors (Antonicka et al., 2006; Coenen et al., 2004; Smeitink et al., 2006; Valente et al., 2007).

Four translation elongation factor (EF) genes have been hitherto cloned in human, namely EFG1 and EFG2, encoded by *GFM1* and *GFM2* respectively, EFTu encoded by *TUFM* and EFTs encoded by *TSEFM*. Their mutations cause early onset, fatal multiple RC deficiency. Complex II activity is consistently spared and no quantitative or qualitative mtDNA anomalies are found. Studying a cohort of 220 patients with combined RC deficiency and normal mtDNA content, we found *GFM1* mutations in two unrelated families with strikingly different clinical presentations, namely encephalopathy and liver failure. Our study supports the clinical heterogeneity of *GFM1* mutations and suggests that this clinical heterogeneity could be accounted for by the location of the mutations on the EFG1 protein.

## 2. Patient and methods

Patient 1, the first boy of consanguineous Algerian parents, was born after a 40 week pregnancy and normal delivery (birth weight 2930 g, length 48.5 cm, head circumference 32 cm). Immediately after birth, he presented feeding difficulties and vomiting. Subsequently, he developed

\* Corresponding author at: Department of Genetics, Hôpital Necker-Enfants Malades, Université Paris Descartes and INSERM U781, 149 rue de Sèvres, 75015 Paris, France. Tel.: +33 1 44 38 15 84; fax: +33 1 44 49 51 50.

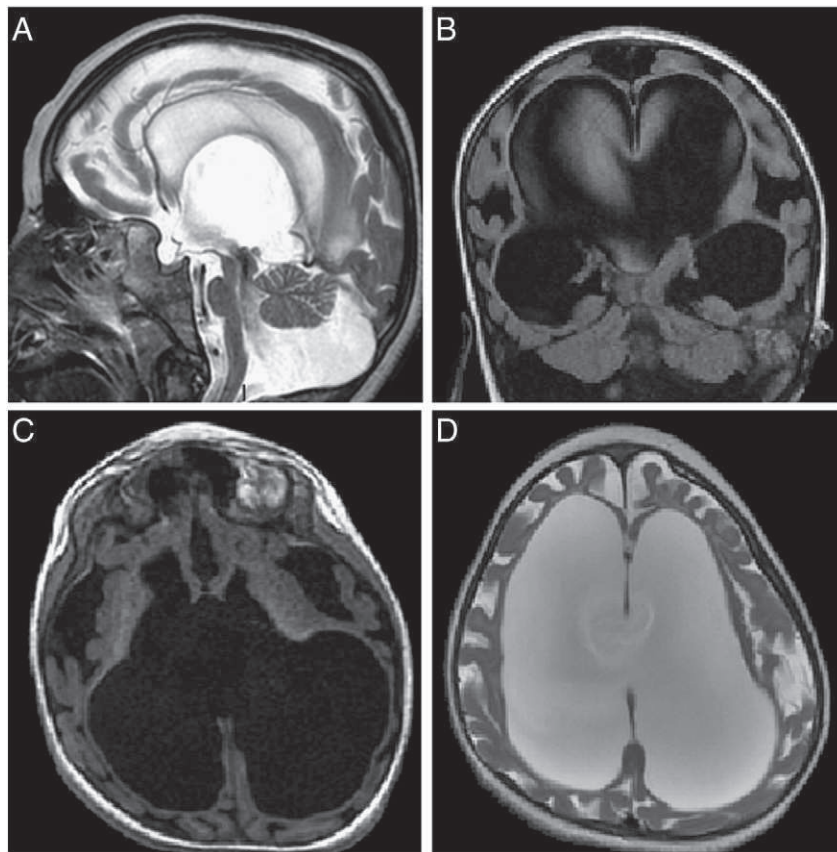
E-mail address: [agnes.rotig@inserm.fr](mailto:agnes.rotig@inserm.fr) (A. Rötig).

a severe encephalopathy with microcephaly, coarse facies, trunk hypotonia, symmetric pyramidal tract signs and generalized dystonia. He never made social or motor progresses and his condition worsened. He developed distal polyneuropathy with areflexia and cold, hypotrophic *pes cavus*. Suction and swallowing difficulties with gastroesophageal reflux required percutaneous gastrostomy to prevent aspiration pneumonia. No clinical seizures were noted but EEG showed bursts of multifocal spikes combined with theta rhythmic activity, without any physiological features. He died at 4 years of age.

Midsagittal T2-weighted brain magnetic resonance imaging (MRI) sections showed hypoplasia of the vermis and severe pontine atrophy of the brainstem (Fig. 1). Coronal Fluid Attenuated Inversion Recover (FLAIR), axial T1-weighted and axial T2-weighted sections disclosed major atrophy at the supra-tentorial level, with some parenchymal loss of white matter, cortex and basal ganglia (Fig. 1). [<sup>1</sup>H] MRS spectroscopy detected a lactate peak at the supra-tentorial level. Plasma lactate (2–3 mmol/l, normal range <2 mmol/l) and alanine were mildly elevated (512 μmol/l, normal range 274 ± 50 μmol/l). Urinary organic acid chromatography was normal. Electroretinogram was normal as well but electromyogram revealed motor–sensory axonal neuropathy. Assessment of respiratory chain (RC) enzyme revealed a severely decreased complex IV activity in muscle mitochondria (Table 2). Histopathological study of the muscle specimen showed subsarcolemmal aggregates and a massive decrease of COX activity. No mtDNA mutation could be identified using the Surveyor endonuclease. Moreover, neither large mtDNA deletion nor depletion was observed in the patient's muscle. A reduced activity of complexes I and IV was observed in cultured skin fibroblasts. This prompted us to offer enzymological prenatal diagnosis on chorion villi for

**Table 1**  
Oligonucleotides used for *GFMI* gene sequencing.

EFG1-1F	GCTCTTACAACATTGGCTGC
EFG1-1R	GTGTCACGGCCTCCATTG
EFG1-2F	GGAGGAATAATGTCACCACATAC
EFG1-2R	TGTCAAAAGTCCCGCTGTACC
EFG1-3F	CTGGTCTCAAACCTTTGGCC
EFG1-3R	GAAGTGCTCTAGGCTCTAAGTTAGTC
EFG1-4F	GCACCTAAGGGTTGGTGAATAG
EFG1-4R	GCCAAITTTACTAAAATCAGTGTCC
EFG1-5F	TCTGACCTGATGGTAACACCC
EFG1-5R	TCTGCGTTTGATGAACCTATCC
EFG1-6F	CTTGACCTTAAACTTGCCTATTTCC
EFG1-6R	GCATCATGTCCCTCC
EFG1-7F	AGTAAATCACTTCCCAGCCC
EFG1-7R	AACAAATCATACTCCAACCTCAAAAC
EFG1-8F	CAGCAGTAATATCCCACACACG
EFG1-8R	GCTTTGGAAAATCTCTACCTGC
EFG1-9F	GGAGGGAGTTATGAAGCTTTCC
EFG1-9R	CTAGTGGGGCTCAGGATACC
EFG1-10F	AGCAGAGAGATTCTGCCACG
EFG1-10R	CTTGATGACTGTGGTACTCAACG
EFG1-11F	TTATTTTGGGAAGGAGGAACC
EFG1-11R	AAGAAGATCTCAATACCAACAGAGG
EFG1-12F	TTGGCTGTGTGGTATCCAAG
EFG1-12R	AACCAGAGTACCGCATGAAG
EFG1-13F	TCAACAATGGTGACGTTTTAGTG
EFG1-13R	GGCCAAATAATCCCAAAGTG
EFG1-14F	TTAATAGGAGTTATTTTATTTT
EFG1-14R	TGATAGACAACATGATGGAAGA
EFG1-15F	GAGGGGTGAAATACAGCACAC
EFG1-15R	GCCTAGTGCTCTGGGTGAAG
EFG1-16F	TTGCCGTTTGTGTTTGTACC
EFG1-16R	AAGCCACAATTCAGCAAGG
EFG1-17F	AAATGGCTAAAATGCGCTCTG
EFG1-18R	GAATTTCTGTTCAGCAGCC



**Fig. 1.** Brain MRI of patient 1. A: Midsagittal T2-weighted image, B: coronal FLAIR, C: axial T1-weighted images and D: Axial T2-weighted images.



**Table 2**

Respiratory chain activities in muscle mitochondria and fibroblasts. CI–CV: complexes I–V, CS: citrate synthase. P1: patient 1. P2 : patient 2. C: control. Abnormal values are in bold.

	Muscle mitochondria				Fibroblasts			
	Patient 1	Control	Patient 2	Control	Patient 1	Control	Patient 2	Control
<i>Absolute activities (nmol/min/mg prot)</i>								
CI	42	65.2 ± 16.6			<b>16</b>	35.2 ± 9.4	<b>18.6</b>	31 ± 11
CI + III			385	602 ± 187				
CII	62	98.6 ± 26.3	34	72 ± 26	71	20.1 ± 3.5	74	68 ± 31
CII + III			136	333 ± 100			<b>94</b>	131 ± 44
CIII	749	1258.8 ± 327.5			539	172.3 ± 37.9		
CIV	<b>150</b>	730.3 ± 233.4	<b>297</b>	1367 ± 455	149	108.4 ± 26.7	<b>133</b>	412 ± 59
CV	280	331.0 ± 84.2			81	60.4 ± 7.7		
CS	134	111.2 ± 23.8	900	2120 ± 370	291	78.6 ± 21.0	328	249 ± 97
(in homogenate)								
<i>Activity ratios</i>								
CIV/CI	<b>3.6</b>	10.7 ± 1.9			9.4	10.2 ± 1.1		
CIV/CII	<b>2.4</b>	8.0 ± 0.7			<b>2.1</b>	5.5 ± 0.6		
CIV/CIII	<b>0.2</b>	0.5 ± 0.04			<b>0.3</b>	0.5 ± 0.005		
CII/CI	1.5	1.4 ± 0.3			<b>4.5</b>	1.8 ± 0.3		
CIV/CS	<b>0.6</b>	1.5 ± 0.1			<b>0.5</b>	1.7 ± 0.2		
(in homogenate)								

the next two pregnancies. Severe complex IV deficiency led to discontinue the second pregnancy but the test was normal in the third pregnancy. A normal baby was born. He is now 8 months old and healthy.

Patient 2, a boy born to Israeli Arab consanguineous parents, has three healthy sisters. He was born at 37 weeks of pregnancy by Caesarian section (birth weight 2137 g, head circumference 31 cm). Shortly after birth, he was found to have spasticity with hyperreflexia and contractures. At 30 h of life, he presented hypoglycemia, severe metabolic acidosis (pH 7.16), abnormally high plasma and urinary lactate and ketonuria. Liver function was abnormal (ALAT 127 UI/l, N = 7–40,  $\gamma$ GT 776 UI/l, N = 6–25, LDH 1725, N = 30–200; CPK 1440, N = 30–180). Abdominal ultrasound and echocardiography were normal. He then had severe recurrent episodes of lactic acidosis, developmental delay, microcephaly, dysmorphic features and hypospadias. He died at 20 months of age. Respiratory chain analysis revealed a partial complex IV deficiency in muscle. Reduced activities of complexes I, II + III and IV were observed in cultured skin fibroblasts (Table 2).

### 2.1. SNP genotyping and mutation screening

For SNP genotyping, the GeneChip Human Mapping 10K Array Xba 142 2.0 was used. For mutation screening, the exons of the *GFM1* gene were amplified using specific primers (Table 1) after an initial denaturation at 96 °C for 5 min, followed by 30 cycles of 96 °C for 30 s, 55 °C for 30 s, and 72 °C for 30 s, and a last extension at 72 °C for 10 min. Amplification products were purified by ExoSapIT (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) and directly sequenced using the PRISM Ready Reaction Sequencing Kit (Perkin-Elmer, Oak Brook, IL) on an automatic sequencer (ABI 3130x1; PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

### 2.2. Protein analysis

For blue native-polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE), mitochondria and OXPHOS complexes were isolated as described (Nijtmans et al., 2002). Solubilized OXPHOS proteins (40  $\mu$ g) were loaded onto a 4–16% acrylamide non-denaturing gradient gel (Invitrogen). SDS-PAGE analysis of solubilized mitochondrial proteins extracted from cultured skin fibroblasts was performed using NuPAGE 4–12% Bis-Tris Gel (Invitrogen). Lanes were loaded with

20  $\mu$ g of solubilized mitochondrial proteins. After electrophoresis, gels were transferred to a PVDF membrane (GE-Healthcare) processed for immunoblotting.

### 2.3. Antibodies and ECL detection

Immunodetection was performed using the following primary antibodies: anti-CI-Grim19, CII-SDHA, CIII-core2, CIV-COX1, CV-subunit  $\beta$  antibodies (mouse monoclonal antibodies, Mitosciences) and anti-EFG1 rabbit polyclonal antibody (Protein Tech Group, Inc, Chicago). Secondary antibody detection was performed using peroxidase-conjugated anti-rabbit or anti-mouse IgGs (Abcam). The signal was generated using ECL (Pierce, Rockford, USA).

### 2.4. Homology modeling of the human EFG1 protein

The three dimensional structure of the human EFG1 (residues 41 to 732) was modeled by comparative protein modeling and energy minimization, using the Swiss-Model program (Guex & Peitsch, 1997) in the automated mode. The 2.40 Å coordinate set for the *Thermus thermophilus* ribosomal elongation factor G (EF-G) (pdb code: 2bm0) was used as a template for modeling the human EFG1 protein. Swiss-Pdb Viewer 3.7 (<http://www.expasy.org/spdbv>) was used to analyze the structural insight into EF-G1 mutation and visualize the structures.

### 2.5. Pulse labeling of mitochondrial translation products

In vitro labeling of mitochondrial translation was a modification from Boulet et al. (1992). Briefly, cells were labeled for 45 min at 37 °C in methionine-free DMEM containing 125  $\mu$ Ci/ml [<sup>35</sup>S] methionine and 100  $\mu$ g/ml emetine and chased for 10 min in DMEM + 30  $\mu$ g/ml cold methionine. Total cellular proteins (40  $\mu$ g) were resuspended and incubated for 10 min in PBS containing 2% lauryl maltoside and 1 $\times$  PIC (Sigma). Unsolubilized material was removed by centrifugation at 10,000 g for 10 min and the supernatant was incubated in 8 M urea for 30 min at 37 °C. Loading buffer was added to a final concentration of 100 mM Tris HCl, (pH 6.8), 20% glycerol, 1% SDS, 0.02% bromophenol blue, 1% mercaptoethanol, and 1 mM DTT. Samples were run on 16% SDS-polyacrylamide gels + 8 M urea, dried, then exposed to an Amersham Hyperfilm™ MP for 3–5 days.

### 3. Results

#### 3.1. BN-PAGE analysis

Mitoplasts isolated from skin fibroblasts of patient 1 were analyzed using Blue Native Gel Electrophoresis. The gel was subsequently blotted and incubated with five antibodies specific of the five RC complexes (GRIM-19 for complex I, 70 KDa for complex II, core II for complex III, COX2 for complex IV and subunit  $\beta$  for complex V, Fig. 2A). This revealed a marked decrease of fully-assembled complexes I, IV and V as compared to controls whereas complex II was normal. Moreover, lower molecular weight subcomplexes could be observed after incubation with GRIM-19, and ATPase  $\beta$  subunit.

#### 3.2. In vitro translation

Analysis of mtDNA protein synthesis in cultured skin showed a reduced amount of COX1 subunit in patient 1. Densitometric comparison gave a mean reduction of 23% of COX1 for patient 1 whereas other subunits were not modified. No additional or abnormal band could be detected (Fig. 2C). Reduced steady-state level of COX1 subunit was confirmed by Western-blot analysis (Fig. 2B).

#### 3.3. Homozygosity mapping, *GFM1* sequencing and Western-blot analysis

A genome-wide linkage analysis using Affymetrix gene-chip SNP 10K array in patient 1 detected 18 regions of homozygosity ranging from 5 to 35 Mb. This represented a total of 265 Mb and encompassed more than 60 known genes encoding mitochondrial proteins

including *GFM1*. Patient 2 presented 3 regions of homozygosity (6 to 46 Mb), encompassing 297 genes, 18 of them encoding mitochondrial proteins (including *GFM1*). As the brain MRI of patient 1 and in vitro translation studies were reminiscent of other cases of mitochondrial translation deficiency, we focused our attention on genes encoding proteins of the translation machinery. Sequencing *GFM1* exons and exon–intron boundaries in patient 1 identified a homozygous C to T transversion at nt 2011 in exon 16, changing a highly conserved arginine into a cysteine (R671C, Fig. 3A). The two parents were heterozygous for this mutation, the affected fetus was homozygous and the normal child was wild-type homozygous. In patient 2, we identified a homozygous T to C transition at nt 1193 in exon 9 changing a conserved leucine into a proline (L398P, Fig. 3A). Both parents were heterozygous for the mutation. No DNA of the three healthy sisters was available. These two amino acid changes were predicted to be probably damaging by Polyphen software and were absent from 220 healthy controls including 100 controls of the same ethnic origins.

Western-blot analyses using anti-EFG1 antibodies showed that the specific protein was reduced to less than 1% of control values in patient 1 fibroblasts (Fig. 2B).

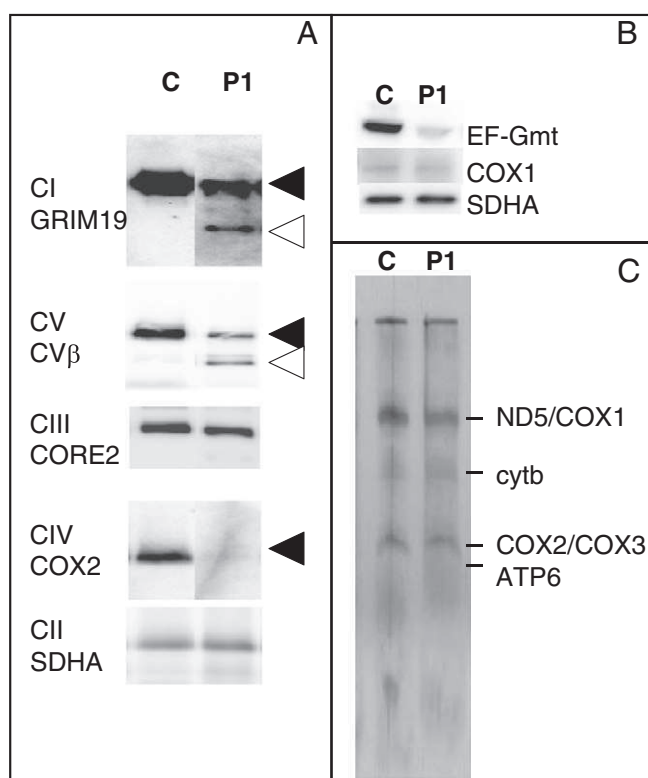
#### 3.4. In silico analysis of the putative impact of the L398P and R671C mutations

The L398P and R671C mutations occurred in highly conserved regions of the protein, in domains 2 and 5 respectively. Because EFG1 is 42.5% identical in amino acid sequence to the *Thermus thermophilus* ribosomal elongation factor G, we used the crystal structure 2bm0 to model human EFG1 and analyze the structural impact of the missense mutations (Fig. 3B). The crystallographic and the modeled structures appeared strikingly similar (not shown). The amino acid L398 is located in domain 2, a rich-beta-sheet region (Czworkowski et al., 1994). The C=O group of the L398 may establish a hydrogen bond with the N–H of V409 of the adjacent strand. Replacement of L398 by a proline would break the beta-sheet structures in this globular protein and disrupt the H-bond network and therefore destabilize domain 2. One of the lateral chains of the R671 residue possibly interacts with the D695 residue, via a hydrogen stabilizing bond. Therefore, the R671C mutations is predicted to alter the electrostatic properties of the protein, accounting for the dramatic decrease of EFG1 protein to less than 1% of controls in cultured fibroblasts. Moreover, the R671 residue was located in a loop, at the end of an  $\alpha$ -helix that has been shown to possibly interact with the C-terminal tail of L6 ribosomal protein in *E. coli* (Nechifor & Wilson, 2007).

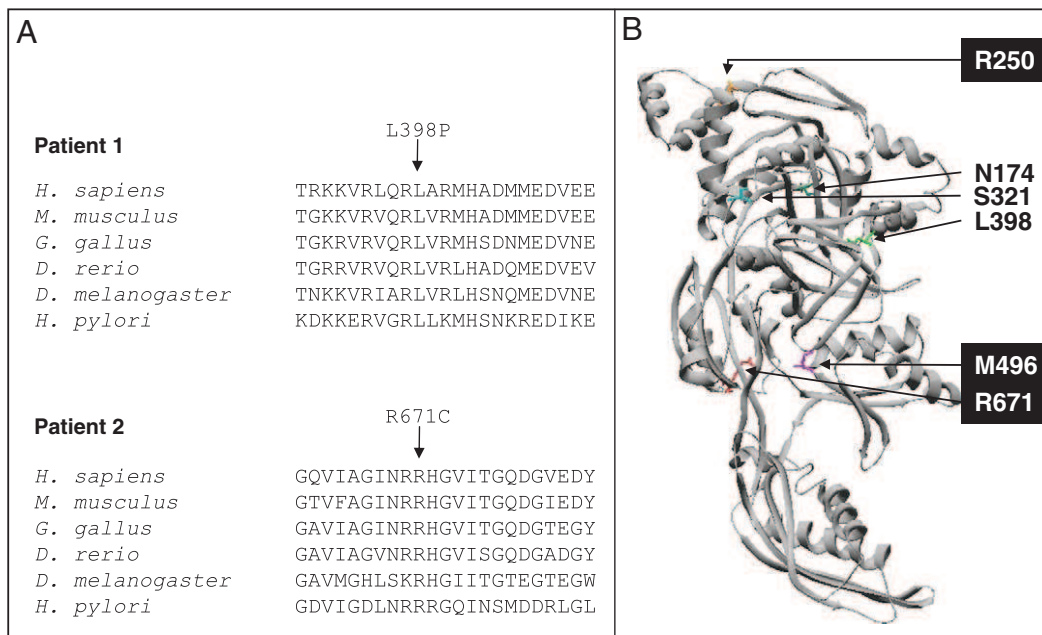
### 4. Discussion

Translation deficiencies represent a novel and growing cause of multiple RC deficiencies. Indeed, mutations in various genes of the mitochondrial translation machinery have been shown to cause multiple RC deficiency (*MRPS16* (Miller et al., 2004), *MRPS22* (Saada et al., 2007), *GFM1* (Antonicka et al., 2006; Coenen et al., 2004; Smits et al., 2011), *EFTs* (Smeitink et al., 2006), *EFTu* (Valente et al., 2007), *PUS1* (Bykhovskaya et al., 2004), *TRMU* (Zeharia et al., 2009), *RARS2* (Edvardson et al., 2007), *DARS2* (Scheper et al., 2007), *YARS2* (Riley et al., 2010), *SARS2* (Belostotsky et al., 2011), *HARS2* (Pierce et al., 2011)). Yet, apart for *DARS2*, *PUS1* and *TRMU* mutations, those mutations are currently private, hampering to establish any genotype–phenotype correlations. Moreover, several mitochondrial translation components have still to be identified as it has been recently shown with the identification of *C12orf65* mutations in two unrelated pedigrees (Antonicka et al., 2010).

Here we report novel *GFM1* mutations in two unrelated patients with different clinical presentations namely an early and severe encephalopathy with long survival and an early onset and fatal liver



**Fig. 2.** A: BN-PAGE and Western blot analysis of mitochondria from cultured skin fibroblasts of patient 1 (P1) and control (C) using antibodies against GRIM19 for complex I (CI), SDHA for complex II (CII), core 2 for complex III (CIII), COX2 for complex IV (CIV) and  $F_1\beta$  subunits for complex V (CV). Filled arrows indicate low amount of CI, CIV and CV. Empty arrows indicate additional bands. B: Western blot analysis of EFG1, COX1 and SDHA proteins in patient 1 (P1) and control (C). C: Analysis of mitochondrial translation products in patient 1 (P1) and control (C).



**Fig. 3.** A: Sequence alignment of the mitochondrial G elongation factor proteins from human and non-human sources showing the mutations of patients 1 and 2. B: Model of the three dimensional structure of the EFG1 protein (with the crystal structure of *Thermus thermophilus* ribosomal elongation factor G (PDB code 2bm0) as a template). The various EFG1 known mutations are represented. R250W, M496R and R671C mutations are associated with encephalopathy; N174S, S321P and L398P with hepatic failure.

failure. This study supports the view that mitochondrial translation deficiency is a growing cause of hepatic failure of mitochondrial origin with no quantitative or qualitative mtDNA anomalies. Nevertheless, *GFM1* did not represent a prevalent cause of hepatic failure as we failed to find another case in a series of 26 additional patients with similar clinical presentation. Both of our patients presented an isolated complex IV but a multiple RC deficiency in muscle and fibroblasts respectively suggesting that the EFG1 modifications impact variably on mitochondrial protein synthesis in these different tissues. It should be also mentioned that normal RC activity has been observed in a previously reported patient with *GFM1* mutation (Smits et al., 2011). Therefore discrepancy of RC deficiency in muscle and fibroblasts could perhaps be a tool for diagnosing *GFM1* mutations.

It is worth noting that the brain MRI images of patient 1 were similar to those reported in other patients with various translation deficiencies (Edvardson et al., 2007; Valente et al., 2007). It is tempting to hypothesize therefore that the combination of severe supratentorial atrophy and severe pontine atrophy of the brainstem should be regarded as a suggestive/distinctive feature in mitochondrial translation defects. Future reports will hopefully help deciding whether cerebro-cerebello-pontine atrophy is indeed a consistent feature in all forms of mitochondrial translation deficiency.

To date four patients have been reported to carry *GFM1* mutations associated with either encephalopathy (R47X/M496R and R250W) (Smits et al., 2011; Valente et al., 2007) or liver dysfunction (N174S and S321P/L607X) (Antonicka et al., 2006; Coenen et al., 2004). Why mutations in the same gene produce so different clinical consequences is still unclear. It has been hypothesized that mutations in various regions of the EFG1 protein may have distinct effects on mitochondrial translation (Valente et al., 2007). Our identification of two novel mutations prompted us to map all known missense mutations on the crystal structure of the protein. Hepatic failure was associated with mutations located in the central part of the protein (N174S, S321P and L398P). Conversely mutations associated with encephalopathy (M496R, R250W and R671C) were located in peripheral regions of the protein (Fig. 3). EFG1 is one of the hundred mitochondrial translation proteins and is involved in various physical and functional interactions. Indeed, the bacterial EF-G, homologous to human EFG1, is known to bind several ribosomal proteins and rRNAs (Nechifor &

Wilson, 2007). Functional interaction between the EFG1, EFTu and EFTs human translation factors has been clearly established as EFG1 mutations resulted in an adaptive response of EFTu and EFTs (Antonicka et al., 2006). Apart for the GTP binding domain, the function of the various structural domains of EFG1 protein is not well known hampering to clearly establish correlations between the localization of the mutations and a specific function of the protein. Nevertheless, one can hypothesize that different parts of EFG1 protein interact with distinct proteins that have variable expression levels across tissues. In this case, the clustering of mutations in specific area of the 2D structure of the protein could be related to tissue-specific involvement observed in patients. Identification of additional EFG1 mutations will hopefully support this hypothesis.

It is important therefore to accumulate additional cases of *GFM1* mutations to better delineate the clinical spectrum of mitochondrial translation defects and hopefully identify discriminating clinical/brain MRI features for an earlier, easier and faster diagnosis of those underdiagnosed conditions.

#### Acknowledgments

This research was supported in part by the Association Française contre les Myopathies (AFM), the French Agence Nationale pour la Recherche (ANR) and the Israeli Ministry of Health.

#### References

- Antonicka, H., Sasarman, F., Kennaway, N.G., Shoubridge, E.A., 2006. The molecular basis for tissue specificity of the oxidative phosphorylation deficiencies in patients with mutations in the mitochondrial translation factor EFG1. *Hum. Mol. Genet.* 15 (11), 1835–1846.
- Antonicka, H., Ostergaard, E., Sasarman, F., Weraarpachai, W., Wibrand, F., Pedersen, A.M., Rodenburg, R.J., van der Knaap, M.S., Smeitink, J.A., Chrzanowska-Lightowlers, Z.M., Shoubridge, E.A., 2010. Mutations in C12orf65 in patients with encephalomyopathy and a mitochondrial translation defect. *Am. J. Hum. Genet.* 87 (1), 115–122.
- Belostotsky, R., Ben-Shalom, E., Rinat, C., Becker-Cohen, R., Feinstein, S., Zeligson, S., Segel, R., Elpeleg, O., Nassar, S., Frishberg, Y., 2011. Mutations in the mitochondrial seryl-tRNA synthetase cause hyperuricemia, pulmonary hypertension, renal failure in infancy and alkalosis, HUPRA syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 88 (2), 193–200.
- Boulet, L., Karpati, G., Shoubridge, E.A., 1992. Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am. J. Hum. Genet.* 51 (6), 1187–1200.



- Bykhovskaya, Y., Casas, K., Mengesha, E., Inbal, A., Fischel-Ghodsian, N., 2004. Missense mutation in pseudouridine synthase 1 (PUS1) causes mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA). *Am. J. Hum. Genet.* 74 (6), 1303–1308.
- Coenen, M.J., Antonicka, H., Ugalde, C., Sasarman, F., Rossi, R., Heister, J.G., Newbold, R.F., Trijbels, F.J., van den Heuvel, L.P., Shoubridge, E.A., Smeitink, J.A., 2004. Mutant mitochondrial elongation factor G1 and combined oxidative phosphorylation deficiency. *N. Engl. J. Med.* 351 (20), 2080–2086.
- Czworkowski, J., Wang, J., Steitz, T.A., Moore, P.B., 1994. The crystal structure of elongation factor G complexed with GDP, at 2.7 Å resolution. *EMBO J.* 13 (16), 3661–3668.
- Edvardson, S., Shaag, A., Kolesnikova, O., Gomori, J.M., Tarassov, I., Einbinder, T., Saada, A., Elpeleg, O., 2007. Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *Am. J. Hum. Genet.* 81 (4), 857–862.
- Guex, N., Peitsch, M.C., 1997. SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18 (15), 2714–2723.
- Houtkooper, R.H., Turkenburg, M., Poll-The, B.T., Karall, D., Perez-Cerda, C., Morrone, A., Malvagia, S., Wanders, R.J., Kulik, W., Vaz, F.M., 2009. The enigmatic role of tafazzin in cardiolipin metabolism. *Biochim. Biophys. Acta* 1788 (10), 2003–2014.
- Jacobs, H.T., Turnbull, D.M., 2005. Nuclear genes and mitochondrial translation: a new class of genetic disease. *Trends Genet.* 21 (6), 312–314.
- Miller, C., Saada, A., Shaul, N., Shabtai, N., Ben-Shalom, E., Shaag, A., Hershkovitz, E., Elpeleg, O., 2004. Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Ann. Neurol.* 56 (5), 734–738.
- Nechifor, R., Wilson, K.S., 2007. Crosslinking of translation factor EF-G to proteins of the bacterial ribosome before and after translocation. *J. Mol. Biol.* 368 (5), 1412–1425.
- Nijtmans, L.G., Henderson, N.S., Holt, I.J., 2002. Blue native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 26 (4), 327–334.
- Pierce, S.B., Chisholm, K.M., Lynch, E.D., Lee, M.K., Walsh, T., Opitz, J.M., Li, W., Klevit, R.E., King, M.C., 2011. Mutations in mitochondrial histidyl tRNA synthetase HARS2 cause ovarian dysgenesis and sensorineural hearing loss of Perrault syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*
- Riley, L.G., Cooper, S., Hickey, P., Rudinger-Thirion, J., McKenzie, M., Compton, A., Lim, S.C., Thorburn, D., Ryan, M.T., Giege, R., Bahlo, M., Christodoulou, J., 2010. Mutation of the mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase gene, YARS2, causes myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia—MLASA syndrome. *Am. J. Hum. Genet.* 87 (1), 52–59.
- Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J.C., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P., Wallace, D.C., 2007. An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.* 35, D823–D828 (Database issue).
- Saada, A., Shaag, A., Arnon, S., Dolfin, T., Miller, C., Fuchs-Telem, D., Lombes, A., Elpeleg, O., 2007. Antenatal mitochondrial disease caused by mitochondrial ribosomal protein (MRPS22) mutation. *J. Med. Genet.* 44 (12), 784–786.
- Scheper, G.C., van der Klok, T., van Andel, R.J., van Berkel, C.G., Sissler, M., Smet, J., Muravina, T.I., Serkov, S.V., Uziel, G., Bugiani, M., Schiffmann, R., Krageloh-Mann, I., Smeitink, J.A., Florentz, C., Van Coster, R., Pronk, J.C., van der Knaap, M.S., 2007. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat. Genet.* 39 (4), 534–539.
- Smeitink, J.A., Elpeleg, O., Antonicka, H., Diepstra, H., Saada, A., Smits, P., Sasarman, F., Vriend, G., Jacob-Hirsch, J., Shaag, A., Rechavi, G., Welling, B., Horst, J., Rodenburg, R.J., van den Heuvel, B., Shoubridge, E.A., 2006. Distinct clinical phenotypes associated with a mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs. *Am. J. Hum. Genet.* 79 (5), 869–877.
- Smits, P., Antonicka, H., van Hasselt, P.M., Weraarpachai, W., Haller, W., Schreurs, M., Venselaar, H., Rodenburg, R.J., Smeitink, J.A., van den Heuvel, L.P., 2011. Mutation in subdomain G' of mitochondrial elongation factor G1 is associated with combined OXPHOS deficiency in fibroblasts but not in muscle. *Eur. J. Hum. Genet.* 19 (3), 275–279.
- Spinazzola, A., Zeviani, M., 2007. Disorders of nuclear-mitochondrial intergenomic communication. *Biosci. Rep.* 27 (1–3), 39–51.
- Valente, L., Tiranti, V., Marsano, R.M., Malfatti, E., Fernandez-Vizarra, E., Donnini, C., Mereghetti, P., De Gioia, L., Burlina, A., Castellani, C., Comi, G.P., Savasta, S., Ferrero, I., Zeviani, M., 2007. Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu. *Am. J. Hum. Genet.* 80 (1), 44–58.
- Zeharia, A., Shaag, A., Pappo, O., Mager-Heckel, A.M., Saada, A., Beinart, M., Karicheva, O., Mandel, H., Ofek, N., Segel, R., Marom, D., Rotig, A., Tarassov, I., Elpeleg, O., 2009. Acute infantile liver failure due to mutations in the TRMU gene. *Am. J. Hum. Genet.* 85 (3), 401–407.

## Exome Sequencing Identifies *MRPL3* Mutation in Mitochondrial Cardiomyopathy

Louise Galmiche,<sup>1,2</sup> Valérie Serre,<sup>1</sup> Marine Beinat,<sup>1</sup> Zahra Assouline,<sup>1</sup> Anne-Sophie Lebre,<sup>1</sup> Dominique Chretien,<sup>1</sup> Patrick Nietschke,<sup>1</sup> Vladimir Benes,<sup>3</sup> Nathalie Boddaert,<sup>2</sup> Daniel Sidi,<sup>2</sup> Francis Brunelle,<sup>2</sup> Marlène Rio,<sup>1</sup> Arnold Munnich,<sup>1</sup> and Agnès Rötig<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Genetics, INSERM U781, Hôpital Necker-Enfants Malades, Université Paris Descartes, Paris, France; <sup>2</sup>Department of Pediatrics, Anatomie et Cytologie Pathologiques, Hôpital Necker-Enfants Malades, Paris, France; <sup>3</sup>Genomics Core Facility, European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg, Germany

Communicated by Jürgen Horst

Received 4 April 2011; accepted revised manuscript 21 June 2011.

Published online 22 July 2011 in Wiley Online Library (www.wiley.com/humanmutation). DOI: 10.1002/humu.21562

**ABSTRACT:** By combining exome sequencing in conjunction with genetic mapping, we have identified the first mutation in large mitochondrial ribosomal protein *MRPL3* in a family of four sibs with hypertrophic cardiomyopathy, psychomotor retardation, and multiple respiratory chain deficiency. Affected sibs were compound heterozygotes for a missense *MRPL3* mutation (P317R) and a large-scale deletion, inherited from the mother and the father, respectively. These mutations were shown to alter ribosome assembly and cause a mitochondrial translation deficiency in cultured skin fibroblasts resulting in an abnormal assembly of several complexes of the respiratory chain. This observation gives support to the view that exome sequencing combined with genetic mapping is a powerful approach for the identification of new genes of mitochondrial disorders.

Hum Mutat 00:1–7, 2011. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

**KEY WORDS:** *MRPL3*; mitochondria; translation; cardiomyopathy

### Introduction

The mitochondrial respiratory chain (RC) consists of five enzyme complexes containing largely 80 protein subunits. Among them, 13 are encoded by the mitochondrial genome and synthesized within the mitochondria. The mitochondrial translation machinery consists of over a hundred different proteins that all are putative candidate genes for translation deficiencies in human. Indeed, translation deficiencies represent a novel and growing cause of multiple RC deficiencies. Hitherto reported mutations involve (1) the ribosomal proteins MRPS16 [Miller et al., 2004] and MRPS22 [Saada et al., 2007], (2) elongation factors EFG1 [Antonicka et al., 2006; Coenen et al., 2004], EFTs [Smeitink et al., 2006], and EFTu [Valente et al., 2007], (3) tRNA modifying enzymes *PUS1* [Bykhovskaya et al., 2004] and *TRMU* [Zeharia et al., 2009], (4) tRNA amino acid

synthetases *RARS2* [Edvardson et al., 2007], *DARS2* [Scheper et al., 2007], *YARS2* [Riley et al., 2010], *SARS2* [Belostotsky et al., 2011], and *HARS2* [Pierce et al., 2011], and finally a gene of unknown function *C12orf65* [Antonicka et al., 2010]. Mutations in *SPG7* and *AFG3L2* encoding *m*-AAA protease, involved in protein quality control and regulating ribosome assembly, result in spastic paraplegia [Nolden et al., 2005]. Finally, a homozygous mutation in *MTPAP* gene, encoding the poly(A) RNA polymerase that also optimizes mitochondrial protein synthesis was identified in an Amish family with spastic ataxia [Crosby et al., 2010].

The 55S mammalian mitochondrial ribosome consists of a small (28S) and a large subunit (39S). The small subunit contains a 12S ribosomal RNA (rRNA) and 30 proteins while the large subunit contains a 16S rRNA and 48 proteins. Both the 12S and the 16S rRNAs are encoded by the mitochondrial genome but all mitochondrial ribosomal proteins (MRP) are nuclearly encoded. Whereas rRNA have catalytic function, ribosomal proteins not only have structural but also biological functions in translation [Brodersen and Nissen, 2005]. Up till now, mutations in two mitochondrial ribosomal proteins only have been reported [Miller et al., 2004; Saada et al., 2007]. Both of them were part of the small ribosomal subunit. Here, we report whole-exome sequencing of a single individual with multiple RC deficiency that allowed us to identify the first mutation in a large ribosomal subunit protein *MRPL3* (MIM# 607118).

### Patients and Methods

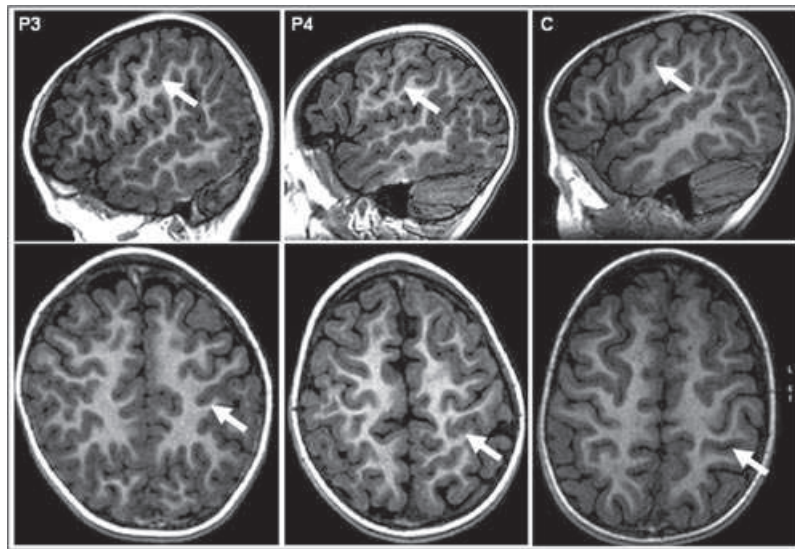
In this sibship born to nonconsanguineous parents, the four patients presented with early onset and severe cardiomyopathy and psychomotor retardation.

Patient 1, a girl, was born at term with normal growth parameters to healthy nonconsanguineous parents of French origin. She developed normally in the first few months of life. At 6 months of age, she presented feeding difficulties and came to medical attention at 7 months of age for failure to thrive, dyspnea, and poor sucking. Examination at 11 months showed hypotrophy (weight –3 SD, height –2 SD) and hepatomegaly. Heart ultrasounds detected hypertrophic cardiomyopathy. Neurological examination was normal. Laboratory investigations revealed persistently high plasma lactate, ranging from 5 to 8 mmol/l (control values <2.2 mmol/L), elevated ALT (103 IU/l, control values: 5–30), AST (103 IU/l, control values: 10–40), and  $\gamma$ GT (97 IU/l, control values: 5–20). She died at 17 months of cardiac and respiratory arrest.

Patient 2, the sister of patient 1, had a very similar clinical course characterized by a disease-free interval in the first months of life,

\*Correspondence to: Agnès Rötig, INSERM U781, Université Paris Descartes, Paris, France. E-mail: agnes.rotig@inserm.fr

Contract grant sponsors: Association Française contre Myopathies (AFM); French Agence Nationale pour la Recherche (ANR).



**Figure 1.** Brain MRI of patients 3 (P3) and 4 (P4) at 2 years of age compared to an age-matched control child (C). Sagittal T1 and Axial T1-weighted images show hypergyria of the cortical brain. White arrows show the postrolandic sulcus in patients and control.

followed by feeding problems and failure to thrive. At 12 months of age, she presented hypertrophic cardiomyopathy and elevated plasma lactate. She died at 15 months of cardiac failure.

The third and fourth children were born at 33 weeks of gestation by caesarean section after a bichorial diamniotic twin pregnancy. Twin 1 (patient 3) was a male infant with a weight of 1,890 g (25th–50th centile), and a length of 45 cm (50th centile). Twin 2 (patient 4) was a female infant with a weight of 2,010 g (50th centile), and a length of 45 cm (50th centile). Systematic clinical examination at 5 months of age revealed hepatomegaly in the two twins. They had elevated plasma lactate and alanine levels with increased lactate/pyruvate molar ratios. They had liver dysfunction with increased levels of AST, ALT, and  $\gamma$ GT but no hepatic insufficiency. Cardiovascular evaluation of the twins was normal at 4 months of age including electrocardiogram, echocoronography, and Doppler. No hypertrophy of the septum and left ventricular free wall, and no systolic or diastolic dysfunction could be noted at this age. Hypertrophic cardiomyopathy was first noted at 9 months of age, with no dysfunction or obstruction. This hypertrophic cardiomyopathy was stable after 2 years, with no signs of obstruction, dysfunction, or arrhythmia. Severe failure to thrive and feeding difficulties required nasal tube feeding at 18 months of age in patient 4. At the age of 30 months, hepatomegaly, hypertrophic cardiomyopathy, and growth failure was unchanged (weight 10.2 kg and 9.2 kg ( $-3$ SD), height 90 cm and 87 cm, OFC 46.5 cm and 45.5 cm for twins 1 and 2, respectively). Yet, they can sit unaided and stand alone. Sagittal T1 and Axial T1-weighted brain MRI sections showed hypergyria of the cortical brain in the two sibs aged 2 years (Fig. 1). Patients 3 and 4 are still alive at 3 years of age.

### Respiratory Chain Analysis

Spectrophotometric assays of RC enzymes were carried out as previously described [Rustin et al., 1994]. Mitochondrial suspension of cultured skin fibroblasts were obtained after suspending 50  $\mu$ l of frozen cells in 1 ml of mitochondria extraction medium (20 mM Tris-HCl (pH 7.2), 250 mM sucrose, 2 mM EGTA, 40 mM KCl, 1 mg/ml BSA) supplemented with 0.01% digitonin and 10% Percoll. After 10 min at 4°C, the sample was centrifuged for 5 min at

5,000 rpm and the pellet was washed in 1 ml of extraction medium with 1 mg/ml BSA and subsequently centrifuged for 5 min at 5,000 rpm. The cell pellet was suspended in 30  $\mu$ l of extraction medium before RC enzyme measurement.

### SNP and Microsatellite Genotyping, Exome Sequencing and Mutation Screening

Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping was performed using the GeneChip Human Mapping 10K Array Xba 142 2.0.

Exome sequencing was performed on genomic DNA of patient 4. Genomic DNA sequencing library was prepared from 3  $\mu$ g of DNA according to the Illumina protocol followed by target enrichment (Agilent SureSelect, All exon kit, Santa Clara, CA) to capture all human exons as described by the manufacturer. Baits present in this kit target regions of approximately 38 Mb in total size. Hence, the kit enables capture of approximately 1.2% of the human genome. The captured fragments of patient 4 sample were sequenced in single-end 76-base mode using one Illumina Genome Analyzer IIx sequencing lane. Subsequently, the sequenced reads were mapped to human genome reference hg19.

The exons and exon–intron boundaries of the *MRPL3* gene (GenBank X06323.1) were amplified using specific primers (Table 1) after an initial denaturation at 96°C for 5 min, followed by 30 cycles at 96°C for 30 sec, 55°C for 30 sec, and 72°C for 30 sec, and a last extension at 72°C for 10 min. Amplification products were purified by ExoSapIT (Amersham, Buckinghamshire, United Kingdom) and directly sequenced using the PRISM Ready Reaction Sequencing Kit (Perkin-Elmer, Oak Brook, IL) on an automatic sequencer (ABI 3130xl; PE Applied Biosystems, Foster City, CA).

### Protein Analysis

For blue native-polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE), mitochondria and OXPHOS complexes were isolated as described [Nijtmans et al., 2002]. Solubilized OXPHOS proteins (20  $\mu$ g) were loaded on a 4–16% acrylamide nondenaturing gradient gel (Invitrogen, Carlsbad, CA). SDS-PAGE analysis of solubilized

**Table 1. Oligonucleotides Used for MRPL3 Gene Sequencing**

MRPL3-1F	GCCATTGCGAAAACCTCC
MRPL3-1R	CTTCCTTAGGTTAAGGGCCC
MRPL3-2F	ACAGAATCCAAGCCCTTTCC
MRPL3-2R	AGGAAGTTGGAATAAACATGC
MRPL3-3F	AGGCACTTATATCTGTAAAGAACAGTC
MRPL3-3R	TTCAACATCACCCCTTTCTTC
MRPL3-4F	TGGTTGGTGTAGAGGAAAGATG
MRPL3-4R	CCCCAATACACAATTTACCTCAC
MRPL3-5F	AAATAAGGGGAATTGGGTGC
MRPL3-5R	CCTCCCTCTCTCACAGAAAGC
MRPL3-6F	TGGATGTTTCTAATTGCAGAAGAG
MRPL3-6R	CCAGTGTAGGTAACATGAAAGATTTG
MRPL3-7F	AGGAATATTATTGTCAGTTTATAGTTG
MRPL3-7R	ACATGGAGTCCCCTTGTGTGC
MRPL3-8F	TTCTTACTTGGGACCTAGCAG
MRPL3-8R	ATACCCTATCATTACTACCACCATTAC
MRPL3-9F	GGCTTCTATTACAAGTCATCCATAGG
MRPL3-9R	AAACAGCCATTTATTATAAGCCAC
MRPL3-10F	TGATTATGAATAATAGCTGAAAAG
MRPL3-10R	AGGAGAGTATGATTTCTGGTG

mitochondrial proteins extracted from cultured skin fibroblasts was performed using NuPAGE 4–12% Bis-Tris Gel (Invitrogen). Lanes were loaded with 40 µg of solubilized mitochondrial proteins. After electrophoresis, gels were transferred to a PVDF membrane (GE-Healthcare, Saclay, France) processed for immunoblotting.

### Antibodies and ECL Detection

Immunodetection was performed using the following primary antibodies: anti-CI-Grim19, CII-SDHA, CIII-core2, CIV-COX1, CV-subunit β (mouse monoclonal antibodies, Mitosciences, Eugene, OR), and anti-MRPL3 goat polyclonal antibody (Protein Tech

Group, Inc., Chicago, IL). Anti-MRPL12 rabbit polyclonal antibody was a gift from R. Lightowers. Secondary antibody detection was performed using peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-goat, or anti-mouse IgG antibody (Abcam, Cambridge, UK). The signal was generated using ECL (Pierce, Rockford, IL).

### Pulse Labeling of Mitochondrial Translation Products

In vitro labeling of mitochondrial translation was a modification from Boulet et al. [1992]. Briefly, cultured skin fibroblasts were labeled for 45 min at 37°C in methionine-free DMEM containing 125 µCi/ml (<sup>35</sup>S) methionine and 100 µg/ml emetine and chased for 10 min in DMEM + 30 µg/ml cold methionine. Total cellular proteins (40 µg) were resuspended and incubated for 10 min in PBS containing 2% lauryl maltoside and 1× protease inhibitor cocktail (PIC, Sigma, St. Louis, MO). Unsolubilized material was removed by centrifugation at 10,000 g for 10 min and the supernatant was incubated in 8 M urea for 30 min at 37°C. Loading buffer was added to a final concentration of 100 mM Tris HCl, (pH 6.8), 20% glycerol, 1% SDS, 0.02% bromophenol blue, 1% mercaptoethanol, and 1 mM DTT. Samples were run on 16% SDS-polyacrylamide gels + 8 M urea, dried, then exposed to a Amersham Hyperfilm™ MP for 3–5 days.

## Results

### RC Enzyme and BN-PAGE Analysis

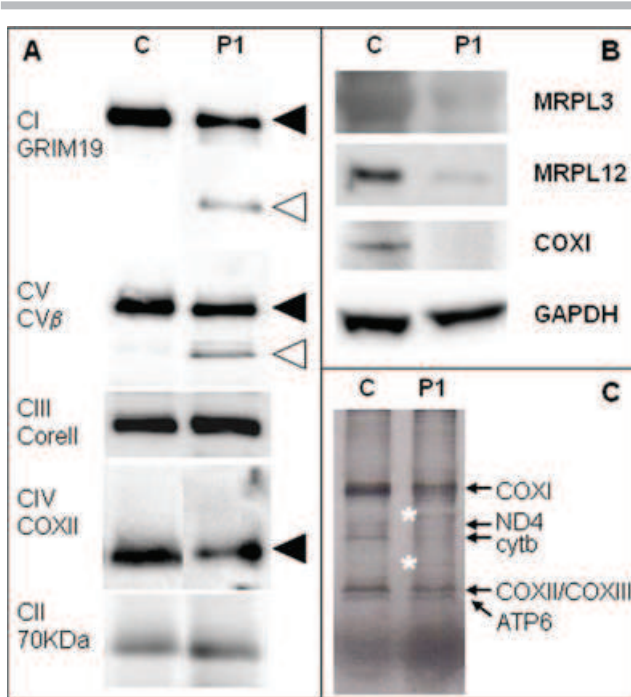
RC enzyme activities performed in muscle and/or fibroblasts of the four patients revealed a combined RC deficiency based on either absolute activities or activity ratios (Table 2). BN-PAGE analysis

**Table 2. Respiratory Chain Activities in Muscle Mitochondria and Fibroblasts**

	Muscle mitochondria			Fibroblasts (Whole cells)				Fibroblasts (Mitochondrial suspension)	
	P1	P4	C	P1	P2	P3	C	P4	C
	Absolute activity (nmol/min/mg prot)								
CI	212	<b>39</b>	50–92			<b>6</b>	10–19	<b>26</b>	30–45
CII	213	66	75–158	21	26	32	21–30	73	63–85
CIII (-LM)	1,051		354–1,284	84	172		63–134		
CIII (+LM)		903	855–1,981			295	191–286	693	612–854
CIV	1402	<b>392</b>	546–1,106	<b>57</b>	<b>92</b>	<b>78</b>	100–152	<b>157</b>	308–429
CV	687	237	209–454			32	18–27	<b>42</b>	54–79
CII+III	648		170–357	26	48	50	31–49	113	106–152
CS		240	272–603	76	99	112	82–111	198	189–255
	Activity ratios								
CI/CII	1.0	0.6	0.7 ± 0.1			<b>0.2</b>	0.6 ± 0.1	<b>0.4</b>	0.5 ± 0.04
CIII (-LM)/CII	<b>4.9</b>		6.6 ± 0.6	4.0	6.6		4.1 ± 0.3		
CIII (+LM)/CII		13.7	15.9 ± 1.4			9.2	9.9 ± 0.7	9.5	10.0 ± 0.8
CIV/CII	6.6	<b>5.9</b>	7.6 ± 0.5	<b>2.7</b>	3.5	<b>2.4</b>	4.7 ± 0.4	<b>2.2</b>	5.0 ± 0.3
CV/CII	3.2	3.6	2.9 ± 0.3			1.0	0.9 ± 0.1	0.6	0.9 ± 0.1
CIV/CI	<b>6.6</b>	10.1	10.7 ± 1.8			13.0	9.4 ± 1.2	<b>6.0</b>	9.9 ± 1.3
CIV/CIII (-LM)	1.3		1.3 ± 0.2	0.7	<b>0.5</b>		1.1 ± 0.2		
CIV/CIII (+LM)		0.4	0.5 ± 0.04			<b>0.3</b>	0.6 ± 0.04	<b>0.2</b>	0.5 ± 0.06
CIV/CV	2.0	1.7	2.7 ± 0.5			<b>2.4</b>	5.5 ± 0.9	3.7	5.7 ± 0.9
CIV/CII+III	2.2		3.2 ± 0.3	<b>2.2</b>	<b>1.9</b>	<b>0.7</b>	3.0 ± 0.2	<b>1.4</b>	2.9 ± 0.2
CI/CS		0.2	0.2 ± 0.02			0.1	0.2 ± 0.03	0.1	0.2 ± 0.02
CII/CS		0.3	0.3 ± 0.02	0.3	0.3	0.3	0.3 ± 0.02	0.4	0.3 ± 0.02
CIII (-LM)/CS				1.1	1.7		1.1 ± 0.1		
CIII (+LM)/CS		3.8	4.2 ± 0.4			2.6	2.7 ± 0.2	3.5	3.3 ± 0.2
CIV/CS		1.6	2.0 ± 0.2	0.8	0.9	<b>0.7</b>	1.3 ± 0.1	0.8	1.7 ± 0.1
CV/CS		1.0	0.8 ± 0.1			0.3	0.3 ± 0.02	0.2	0.3 ± 0.03

CI–CV, complexes I–V; CS, citrate synthase; LM, lauryl maltoside; P1–P4, patients 1–4; C, control. Abnormal values are in bold.





**Figure 2.** **A:** BN-PAGE and Western blot analysis of mitochondria from cultured skin fibroblasts of patient 1 (P1) and control (C) using antibodies directed against GRIM19 for complex I (CI), SDHA for complex II (CII), core II for complex III (CIII), COXII for complex IV (CIV), and  $F_1\beta$  subunits for complex V (CV). Filled arrows indicate low amount of CI, CIV, and CV. Empty arrows indicate additional bands. **B:** Western blot analysis of MRPL3, MRPL12, COXI, COXIV, and core II proteins in patient 1 (P1) and control (C). **C:** Analysis of mitochondrial translation products in patient 1 (P1) and control (C). The white stars show the additional bands.

of mitoplasts isolated from skin fibroblasts of patient 1 revealed a marked decrease of fully assembled complexes I, IV, and V as compared to controls, whereas complex II was normal (Fig. 2A). Moreover, lower molecular weight subcomplexes could be observed after incubation with anti-GRIM-19 and anti-ATPase  $\beta$  antibodies. The same results were observed for patient 4. This result was consistent with a combined RC deficiency affecting mtDNA encoded complexes.

### SNP Genotyping and High Throughput Exome Sequencing

To identify the disease-causing gene, we performed exome sequencing on genomic DNA from leucocytes of patient 4. In parallel, we performed SNP genotyping using 250K NspI array for the four patients and their parents. A total of 34.4 million reads were sequenced by high-throughput exome sequencing and 29.7 millions reads (86.3%) could be mapped to the human genome. Out of the mapable reads, 26 million reads (87%) were close to a target region ( $\pm 500$  bp) with 18.3 million reads (61%) being exactly on-target. About 40% of all target regions have an average coverage higher than  $30\times$  and more than 75% of all targets have a coverage greater than or equal to  $10\times$ . After filtering against dbSNP, 1,000 genomes, noncoding RNA, UTR, and in-house SNP data, exome sequencing identified three genes carrying at least two new heterozygous variants mapping to regions of haploidentity identified by SNP genotyping, but none of them could be considered as a good candidate gene. We then focused on genes carrying homozygous new variants. This designed us two additional genes mapping

to regions of haploidentity. One of these genes, *MRPL3*, encodes a mitochondrial ribosomal protein. Sanger sequencing of *MRPL3* exons and exon–intron boundaries on genomic DNA confirmed the apparently homozygous C to G transition in exon 10 (c.950C>G) of the coding sequence (starting at the first ATG of GenBank sequence X06323.1). This mutation changed a highly conserved proline into an arginine (p.Pro317Arg, Fig. 3). It was predicted to be probably damaging by the Polyphen software and was absent from 220 controls of the same ethnic origin. The mother was heterozygous for the mutation but the father was apparently wild-type homozygous. Sequencing the complete fibroblast *MRPL3* cDNA of the four patients failed to reveal any other sequence variation, but paternal noncontribution at the D3S3548 locus located in *MRPL3* intron 8 suggested that the father was actually hemizygous at the *MRPL3* locus (Fig. 3). Heterozygosity for SNPs rs9813877 and rs9822908 located upstream and downstream *MRPL3*, respectively, allowed to determine that the size of the deletion was less than 400 kb (Fig. 3). Moreover, exome sequencing showed four additional heterozygous SNPs (rs2976150, rs60911235, rs6804080, rs6803922), allowing to reduce the deletion to only 255 kb. The four children are therefore compound heterozygotes for a point mutation (P317R) and a large-scale 255-kb deletion at the *MRPL3* locus. No additional *MRPL3* mutation in a series of six patients with similar clinical presentation and biochemical defect could be identified.

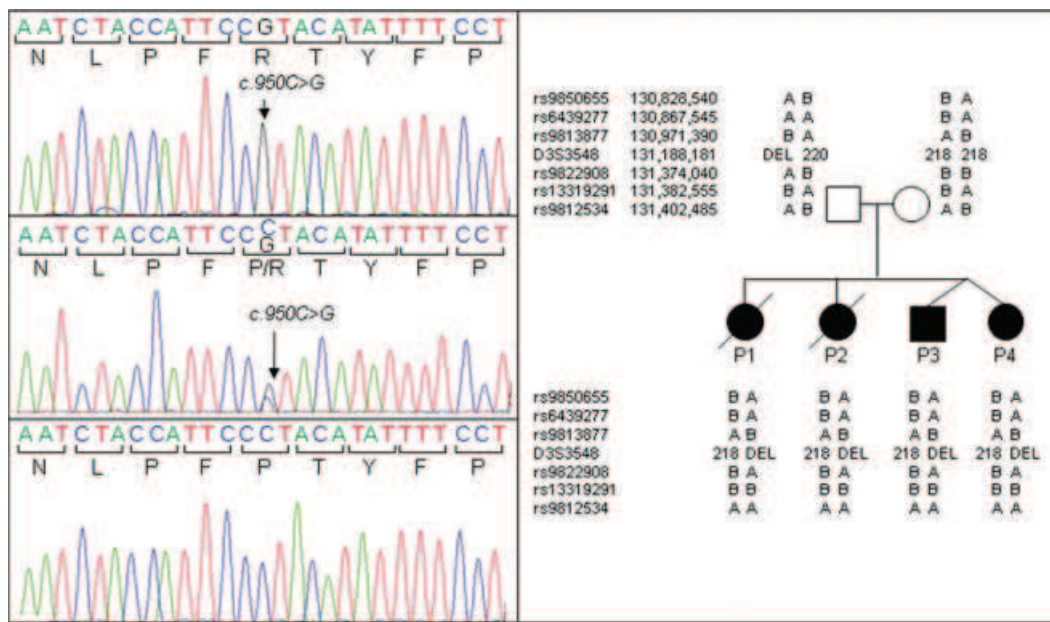
### Western Blot Analysis and In Vitro Translation

Western blot analysis using anti-MRPL3 antibodies showed that the specific protein amount was reduced to 65% of control value in patient fibroblasts (Fig. 2B). Moreover, a 64% decrease in MRPL12 protein amount suggested that the MRPL3 mutation results in an overall defective assembly of the large ribosomal subunit. This was confirmed by a reduction of 16S rRNA content to 56% of the control mean.

In vitro mitochondrial protein translation in cultured skin fibroblasts detected a significantly reduced translation of COXI and COXII subunits (Fig. 2C). Densitometric comparison of patients and controls gave a mean reduction of 59% and 50% of controls for COXI and COXII, respectively. The amount of other subunits averaged 80–90% of control values. Two additional bands of 32 and 25 kDa were observed and could not be ascribed to a known protein species (Fig. 2C). Finally, a reduced steady-state level of COXI subunit was observed by Western blot analysis possibly, due to a secondary defect of complex IV assembly (55% of control value, Fig. 2B).

### In Silico Analysis of the Putative Impact of P317R Mutation

The P317R mutation occurred in a highly conserved region of the protein (Fig. 4A). Moreover, the mutation was located in a predicted random coil region (residues 310–324) (<http://pbil.univ-lyon1.fr/>) and therefore expected to contain loops. Human MRPL3 is 19% identical in amino acid sequence to the *Escherichia coli* L3 ribosomal protein that has been previously crystallized. Unfortunately, the *E. coli* L3 protein is shorter than its human counterpart and the P317 residue is not included in the homology region, hampering homology modeling and analysis of the structural impact of the mutation. Nevertheless, the crystal structure of the large ribosomal subunit of *E. coli* (PDB ID: 2QBI) [Borovinskaya et al., 2007] shows that the C-terminal peptide tail of the L3 protein is probably located in an interface of interaction with other ribosomal subunits and extends in the internal part of the ribosome (Fig. 4B). This suggests



**Figure 3.** Molecular analysis of the *MRPL3* gene (GenBank X06323.1). Left: sequence analysis of *MRPL3* gene in patient 1 (upper panel), mother (middle panel), and father (lower panel). The arrows indicate the mutation. Right: Segregation analysis of SNPs and D3S3548 microsatellite markers in the family showing absence of paternal allele in the four affected children. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at [wileyonlinelibrary.com](http://wileyonlinelibrary.com).]

that the flexible secondary structure composed by the 43 additional amino acids of human MRPL3 could constitute a region required for binding promiscuity and is probably located in the cavity of the ribosome. In that case, the P317R mutation could possibly alter interactions of the protein with either other ribosomal proteins or the 16S rRNA itself.

## Discussion

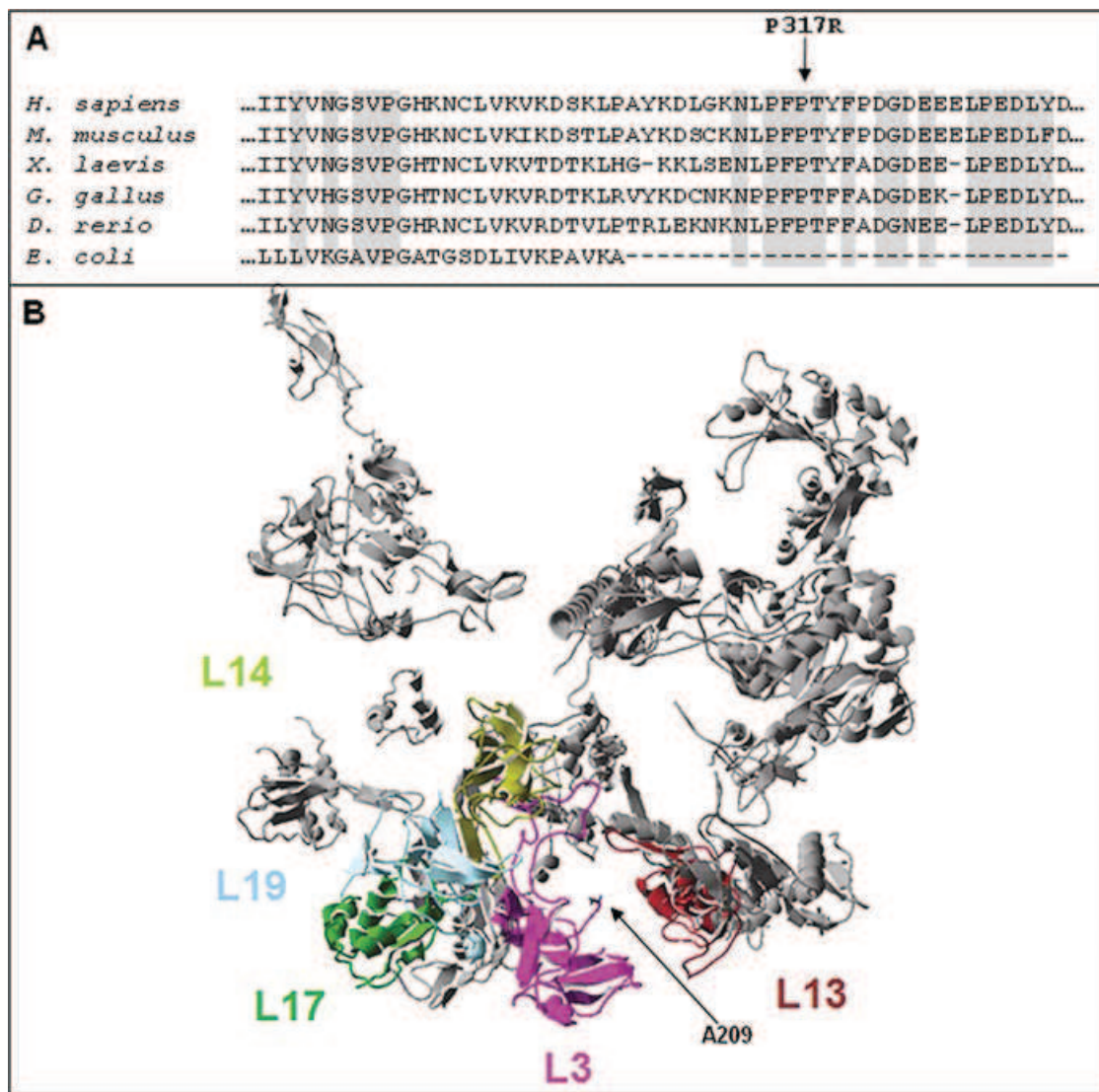
We report here the first mutation in the mitochondrial large ribosomal protein MRPL3 and show that it was the cause of severe hypertrophic cardiomyopathy and translation deficiency in four sibs born to nonconsanguineous parents. Cardiomyopathy, the presenting symptom in our patients, is frequently observed in mitochondrial disorders. Various mitochondrial gene mutations have been associated with cardiomyopathy namely *SCO2*, *TAZ*, and frataxin mutations, in encephalocardiomyopathy [Papadopoulou et al., 1999], Barth syndrome [Bione et al., 1996], and Friedreich ataxia, respectively [Campuzano et al., 1996]. Hypertrophic cardiomyopathy associated with muscle hypotonia and tubulopathy has been also reported in two sisters with *MRPS22* mutations [Saada et al., 2007] and in a girl with *TSM* mutation [Smeitink et al., 2006]. Yet, the disease causing genes in patients with cardiomyopathy associated with RC deficiency remains largely unknown. *MRPL3* should be regarded, therefore, as a new candidate gene in patients with cardiomyopathy and psychomotor retardation.

This mutation was identified by combining genetic mapping and exome sequencing. SNP genotyping identified a total of 120-Mb haploidentity in 8 chromosomal regions containing 710 genes, 35 of them encoding mitochondrial proteins. Unfortunately, the short size of the family hampered to obtain a significant lod score for any of these regions. Exome sequencing was then instrumental as it clearly designed only one obvious candidate gene mapping in a region of

haploidentity, *MRPL3*. This demonstrates that exome sequencing in combination with genetic mapping in small families is effective in the elucidation of the molecular bases of mitochondrial disorders.

The BN-PAGE pattern in patient 1 was similar to those previously reported or that we observed in two of our patients with *GFM1* or *TSM* mutations (submitted). Abnormal assembly of RC in translation deficiency has been documented in *GFM1* [Antonicka et al., 2006; Coenen et al., 2004], *TSM* [Smeitink et al., 2006], *C12orf65* [Antonicka et al., 2010], and *MRPS22* [Smits et al., 2011] mutations. Unfortunately, RC assembly has not been studied in patients with *MRPS16*, *PUS1*, *RARS2*, *YARS2*, and *TRMU* mutations. Future systematic studies should help deciding whether abnormal RC assembly is a consistent feature in translation deficiency and if particular patterns are specific, an important information for diagnostic strategies in RC deficiency in sporadic cases.

The missense *MRPL3* mutation inherited from the mother changed a conserved neutral hydrophobic amino acid (proline), into an arginine, a basic and hydrophilic amino acid. Based on the structure of these amino acids, the mutation is suspected to significantly affect an interface of interaction of the protein and to destabilize the ribosomal subunit. In keeping with this, the decreased amount of MRPL3 and MRPL12 proteins in cultured fibroblasts of the patient not only demonstrates that the mutation alters the stability of MRPL3 but also that it resulted in a defective assembly of the large ribosomal subunit, as previously shown for MRPS16 [Miller et al., 2004] and MRPS22 mutations [Saada et al., 2007]. Human MRPL3 shows significant sequence similarity with the prokaryote L3 ribosomal protein. In *E. coli*, L3 is known to bind the 23S rRNA and may participate to the formation of the peptidyltransferase center of the ribosome [Meskauskas and Dinman, 2008]. Moreover, L3 is one of two proteins capable of initiating assembly of *E. coli* large ribosomal subunits in vitro. We can therefore hypothesize that MRPL3 deficiency alters both the large ribosomal subunit assembly and its peptidyltransferase activity. Ribosomal proteins are located at the



**Figure 4.** **A:** Sequence alignment of the MRPL3 proteins from human and nonhuman sources and of *E. coli* L3 protein. The arrow indicates the mutation. **B:** Crystal structure of the large ribosomal subunit of *E. coli*. L3, L13, L14, L17, and L19 ribosomal proteins are in color. A209 is the last amino acid of the *E. coli* L3 protein.

surface of the ribosomal subunit. As several other ribosomal proteins, *E. coli* L3 protein also presents a long C-terminal peptide tail. These peptide tails are known to extend away from the main core of the protein and anchor it to the rRNA [Brodersen and Nissen, 2005]. The human MRPL3 is 43 amino acid longer, suggesting an even longer peptide tail, possibly entering the ribosome that anchors the protein to the rRNA, increasing their interaction surface. The change of proline 317 into an arginine certainly modifies the structure of the peptide tail and therefore its interaction with the rRNA.

The maximal size of the deletion inherited from the father is 255 kb and encompasses two genes, *TMCC1* encoding a protein with transmembrane and coiled-coil domain but of unknown function and *TRH* encoding the thyrotropin-releasing hormone. None of these genes is predicted to encode a mitochondrial protein [Calvo et al., 2006]. Moreover, as the father is healthy and none of the clinical signs observed in the patients is suggestive of another genetic disease, one can hypothesize that hemizygoty for these genes has no impact on the clinical course of the patients.

In conclusion, *MRPL3* mutations result in hypertrophic cardiomyopathy and psychomotor retardation associated with mitochondrial translation defect. Ongoing studies will help deciding whether this gene is a frequent cause of syndromic cardiomyopathy. Our results support the broad clinical and genetic heterogeneity of mitochondrial translation deficiency and demonstrate that exome sequencing combined with genetic mapping is effective for the identification of rare disease gene mutations.

## References

- Antonicka H, Ostergaard E, Sasarman F, Weraarpachai W, Wibrand F, Pedersen AM, Rodenburg RJ, van der Knaap MS, Smeitink JA, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Shoubbridge EA. 2010. Mutations in C12orf65 in patients with encephalomyopathy and a mitochondrial translation defect. *Am J Hum Genet* 87:115–122.
- Antonicka H, Sasarman F, Kennaway NG, Shoubbridge EA. 2006. The molecular basis for tissue specificity of the oxidative phosphorylation deficiencies in patients with mutations in the mitochondrial translation factor EFG1. *Hum Mol Genet* 15:1835–1846.



- Belostotsky R, Ben-Shalom E, Rinat C, Becker-Cohen R, Feinstein S, Zeligson S, Segel R, Elpeleg O, Nassar S, Frishberg Y. 2011. Mutations in the mitochondrial Seryl-tRNA synthetase cause hyperuricemia, pulmonary hypertension, renal failure in infancy and alkalosis, HUPRA syndrome. *Am J Hum Genet* 88:193–200.
- Bione S, D'Adamo P, Maestrini E, Gedeon AK, Bolhuis PA, Toniolo D. 1996. A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome. *Nat Genet* 12:385–389.
- Borovinskaya MA, Pai RD, Zhang W, Schuwirth BS, Holton JM, Hirokawa G, Kaji H, Kaji A, Cate JH. 2007. Structural basis for aminoglycoside inhibition of bacterial ribosome recycling. *Nat Struct Mol Biol* 14:727–732.
- Boulet L, Karpati G, Shoubridge EA. 1992. Distribution and threshold expression of the tRNA(Lys) mutation in skeletal muscle of patients with myoclonic epilepsy and ragged-red fibers (MERRF). *Am J Hum Genet* 51:1187–1200.
- Brodersen DE, Nissen P. 2005. The social life of ribosomal proteins. *Febs J* 272:2098–2108.
- Bykhovskaya Y, Casas K, Mengesha E, Inbal A, Fischel-Ghodsian N. 2004. Missense mutation in pseudouridine synthase 1 (PUS1) causes mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA). *Am J Hum Genet* 74:1303–1308.
- Calvo S, Jain M, Xie X, Sheth SA, Chang B, Goldberger OA, Spinazzola A, Zeviani M, Carr SA, Mootha VK. 2006. Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nat Genet* 38:576–582.
- Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Canizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, De Michele G, Filla A, De Frutos R, Palau F, Patel PI, Di Donato S, Mandel JL, Coccoza S, Koenig M, Pandolfo M. 1996. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 271:1423–1427.
- Coenen MJ, Antonicka H, Ugalde C, Sasarman F, Rossi R, Heister JG, Newbold RF, Trijbels FJ, van den Heuvel LP, Shoubridge EA, Smeitink JA. 2004. Mutant mitochondrial elongation factor G1 and combined oxidative phosphorylation deficiency. *N Engl J Med* 351:2080–2086.
- Crosby AH, Patel H, Chioza BA, Proukakis C, Gurtz K, Patton MA, Sharifi R, Harlalka G, Simpson MA, Dick K, Reed JA, Al-Memar A, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Cross HE, Lightowlers RN. 2010. Defective mitochondrial mRNA maturation is associated with spastic ataxia. *Am J Hum Genet* 87:655–660.
- Edvardson S, Shaag A, Kolesnikova O, Gomori JM, Tarassov I, Einbinder T, Saada A, Elpeleg O. 2007. Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer RNA synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia. *Am J Hum Genet* 81:857–862.
- Meskauskas A, Dinman JD. 2008. Ribosomal protein L3 functions as a 'rocker switch' to aid in coordinating of large subunit-associated functions in eukaryotes and Archaea. *Nucleic Acids Res* 36:6175–6186.
- Miller C, Saada A, Shaul N, Shabtai N, Ben-Shalom E, Shaag A, Hershkovitz E, Elpeleg O. 2004. Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation. *Ann Neurol* 56:734–738.
- Nijtmans LG, Henderson NS, Holt IJ. 2002. Blue native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes. *Methods* 26:327–334.
- Nolden M, Ehes S, Koppen M, Bernacchia A, Rugarli EI, Langer T. 2005. The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell* 123:277–289.
- Papadopoulou LC, Sue CM, Davidson MM, Tanji K, Nishino I, Sadlock JE, Krishna S, Walker W, Selby J, Glerum DM, Coster RV, Lyon G, Scalais E, Lebel R, Kaplan P, Shanske S, De Vivo DC, Bonilla E, Hirano M, DiMauro S, Schon EA. 1999. Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene. *Nat Genet* 23:333–337.
- Pierce SB, Chisholm KM, Lynch ED, Lee MK, Walsh T, Opitz JM, Li W, Klevit RE, King MC. 2011. Mutations in mitochondrial histidyl tRNA synthetase HARS2 cause ovarian dysgenesis and sensorineural hearing loss of Perrault syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Riley LG, Cooper S, Hickey P, Rudinger-Thirion J, McKenzie M, Compton A, Lim SC, Thorburn D, Ryan MT, Giege R, Bahlo M, Christodoulou J. 2010. Mutation of the mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase gene, YARS2, causes myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia-MLASA syndrome. *Am J Hum Genet* 87:52–59.
- Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM, Munnich A. 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35–51.
- Saada A, Shaag A, Arnon S, Dolfin T, Miller C, Fuchs-Telem D, Lombes A, Elpeleg O. 2007. Antenatal mitochondrial disease caused by mitochondrial ribosomal protein (MRPS22) mutation. *J Med Genet* 44:784–786.
- Scheper GC, van der Kloot T, van Andel RJ, van Berkel CG, Sissler M, Smet J, Muravina TI, Serkov SV, Uziel G, Bugiani M, Schiffmann R, Krageloh-Mann I, Smeitink JA, Florentz C, Van Coster R, Pronk JC, van der Knaap MS. 2007. Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation. *Nat Genet* 39:534–539.
- Smeitink JA, Elpeleg O, Antonicka H, Diepstra H, Saada A, Smits P, Sasarman F, Vriend G, Jacob-Hirsch J, Shaag A, Rechavi G, Welling B, Horst J, Rodenburg RJ, van den Heuvel B, Shoubridge EA. 2006. Distinct clinical phenotypes associated with a mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs. *Am J Hum Genet* 79:869–877.
- Smits P, Saada A, Wortmann SB, Heister AJ, Brink M, Pfundt R, Miller C, Haas D, Hantschmann R, Rodenburg RJ, Smeitink JA, van den Heuvel LP. 2011. Mutation in mitochondrial ribosomal protein MRPS22 leads to Cornelia de Lange-like phenotype, brain abnormalities and hypertrophic cardiomyopathy. *Eur J Hum Genet* 19:394–399.
- Valente L, Tiranti V, Marsano RM, Malfatti E, Fernandez-Vizcarra E, Donnini C, Mereghetti P, De Gioia L, Burlina A, Castellan C, Comi GP, Savasta S, Ferrero I, Zeviani M. 2007. Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu. *Am J Hum Genet* 80:44–58.
- Zeharia A, Shaag A, Pappo O, Mager-Heckel AM, Saada A, Beinat M, Karicheva O, Mandel H, Ofek N, Segel R, Marom D, Rotig A, Tarassov I, Elpeleg O. 2009. Acute infantile liver failure due to mutations in the TRMU gene. *Am J Hum Genet* 85:401–407.





# *DISCUSSION ET PERSPECTIVES*

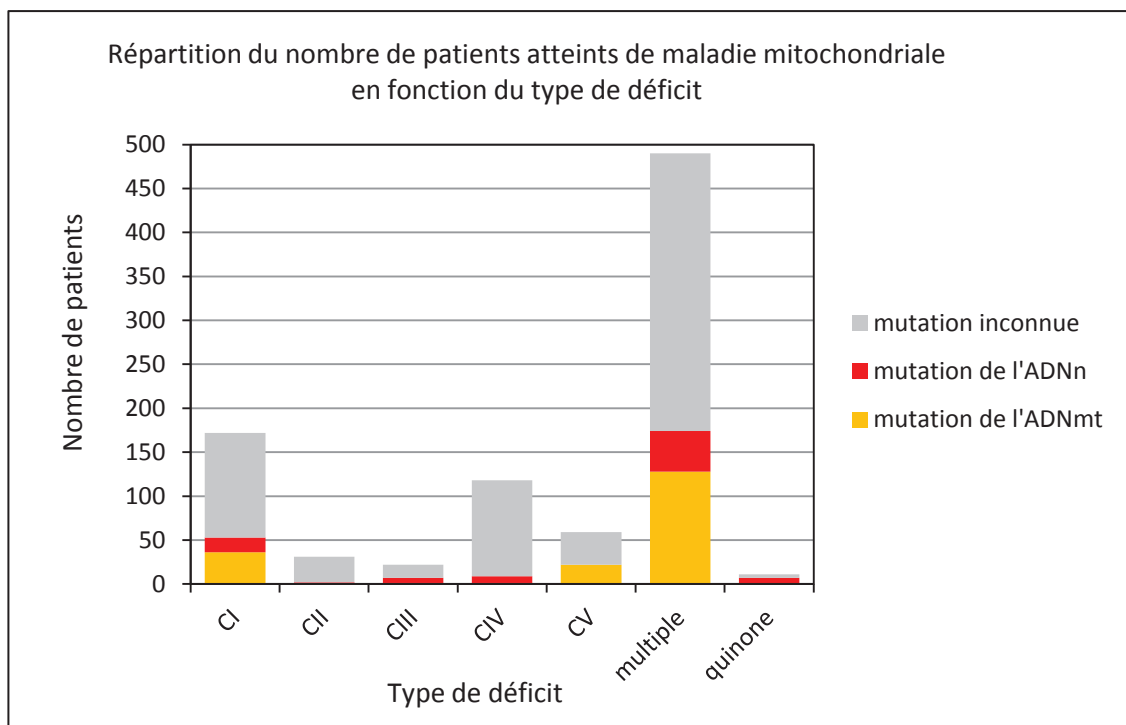
---

---



Bien que les maladies mitochondriales représentent une des causes les plus fréquentes des maladies métaboliques, leurs bases génétiques restent encore largement incomprises. Ceci est largement lié au fait qu'elles sont caractérisées par une grande variabilité phénotypique et génétique, rendant leur diagnostic parfois très difficile à établir.

La Figure 62 illustre la répartition des patients atteints de maladie mitochondriale en fonction du type de déficit. Parmi les 490 patients atteints de déficits multiples de l'hôpital Necker-Enfants Malades, la forte proportion (environ 65%) d'individus dont la cause génétique est inconnue encourage fortement l'étude des bases génétiques responsables de ces déficits.



**Figure 62 :** Répartition des patients de l'hôpital Necker-Enfants Malades en fonction du type de déficit et caractérisation génétique de ces déficits.

Une atteinte hépatique est un signe clinique souvent retrouvé dans les maladies mitochondriales de l'enfant. En effet, environ 30% de nos patients ayant un déficit multiple présentent une atteinte hépatique mitochondriale. L'atteinte hépatique est le deuxième signe le plus fréquemment observé dans notre cohorte, après les atteintes neurologiques. Si les atteintes hépatiques mitochondriales sont relativement homogènes cliniquement, elles sont associées à de nombreuses causes génétiques. Un sous-groupe bien caractérisé de patients présente des déplétions de l'ADNmt associées à des mutations de gènes impliqués dans la réplication de l'ADNmt ou dans la synthèse de dNTP pour la réplication du génome mitochondrial. Nous nous

sommes attachés à identifier les mutations responsables d'atteinte hépatique sans déplétion de l'ADNmt. Pour ce faire, nous avons dans ce travail de thèse, constitué une cohorte unique de 70 patients ayant une atteinte hépatique mitochondriale. Dans la mesure du possible, une déplétion de l'ADNmt avait été préalablement exclue quand des biopsies de foie des patients étaient disponibles. Pour tous les patients de cette série, nous disposons de fibroblastes.

## I. EXCLUSION DES GENES CONNUS D'ATTEINTE HEPATIQUE

Au début de ce travail de thèse, le seul gène connu d'atteinte hépatique sans déplétion de l'ADNmt était *GFM1* (Coenen, Antonicka et al. 2004). La caractérisation génétique de notre cohorte de patients atteinte hépatique mitochondriale sans déplétion de l'ADNmt a commencé par la mise en évidence de mutations dans le gène *TRMU* chez deux patients de notre cohorte (Zeharia, Shaag et al. 2009). S'en est suivie l'identification de mutations du gène *TSMF* dans une de nos familles (Vedrenne, Galmiche et al. 2012). Le gène *LARS* a récemment été identifié comme causant des atteintes hépatiques mitochondriales. Cependant, bien que les patients avec mutations de *LARS* aient une atteinte pluriviscérale très évocatrice de maladie mitochondriale, ils ne présentent pas d'anomalie de la chaîne respiratoire et l'extinction de *LARS* par siRNA n'affecte pas la mitochondrie (Casey, McGettigan et al. 2012). En revanche, les gènes *GFM1*, *TSMF* et *TRMU* codent pour des protéines de la traduction mitochondriale et leurs mutations conduisent à des anomalies de la synthèse des protéines codées par l'ADNmt.

Ces mutations décrites doivent être prises en compte dans le diagnostic génétique des atteintes hépatiques mitochondriales sans déplétion de l'ADNmt. Toutefois, une difficulté majeure concernant le diagnostic génétique réside dans le fait que chaque mutation ne concerne que très peu de familles et de patients. Nous avons voulu estimer leur incidence dans notre cohorte de patients.

En combinant un séquençage haut débit, un séquençage Sanger et une cartographie génétique dans le cadre de cas familiaux, nous avons pu exclure la présence de mutations dans les gènes *TRMU*, *TSMF*, *GFM1* et *LARS* chez 40 patients atteinte hépatique mitochondriale sans déplétion de l'ADNmt. Nous avons donc démontré que ce groupe de patients se caractérisait par une grande hétérogénéité génétique, et ce premier résultat montre qu'il n'y a pas de gènes majeurs, contrairement aux atteintes hépatiques mitochondriales avec déplétion de l'ADNmt.

## II. TRANSCRIPTOME

Cette hétérogénéité rend la caractérisation génétique de l'ensemble des patients de la cohorte assez difficile et nous a contraints pour toutes les analyses effectuées à étudier chaque patient individuellement. Cela a été la limitation majeure pour l'analyse transcriptomique, qui ne nous a pas permis de mettre en évidence un gène sous-exprimé révélateur d'un ARNm instable. Nous avons alors utilisé cette analyse comme un outil pour faire des sous-groupes au sein de cette cohorte hétérogène génétiquement et avons mis en évidence un sous-groupe de 6 patients ayant un profil commun et similaire aux patients mutés dans *TRMU*, suggérant que ces 6 patients pourraient présenter une anomalie de la traduction mitochondriale. Cependant, ceci ne nous aide que faiblement pour identifier le gène en cause, étant donné le nombre très important de gènes impliqués dans la traduction mitochondriale qu'il faudrait investiguer. On connaît en effet à ce jour environ 100 gènes nucléaires impliqués dans la traduction mitochondriale (Rotig 2011), qui ne peuvent raisonnablement pas tous être séquencés en séquençage Sanger dès lors que l'on suspecte une anomalie de traduction mitochondriale. De plus il existe sûrement de nombreux facteurs de traduction encore inconnus à ce jour.

## III. IDENTIFICATION DE NOUVEAUX GENES D'ATTEINTE HEPATIQUE PAR SEQUENÇAGE HAUT DEBIT EXOME

Du fait du grand nombre de cas sporadiques de notre cohorte, le séquençage exome nous paraissait un outil très prometteur pour l'identification de gènes.

Nous avons identifié des variations pour environ 45% des 38 patients séquencés. Les gènes impliqués sont des gènes codant pour des protéines de la traduction mitochondriale, des protéines de fonction mal connue mais prédite pour être mitochondriale, ou des protéines mitochondriales dont la fonction n'est pas reliée directement à la chaîne respiratoire. Certaines variations détectées étaient des faux positifs, donc des artefacts de la technique de séquençage, puisque nous n'avons pas pu les confirmer par séquençage Sanger (*AARS2*, *DGUOK*). Une variation mise en évidence dans le gène *AARS2* pour le patient 31 était un faux négatif, puisque nous l'avons identifiée en séquençant un exon non couvert par le séquençage exome. Une grande partie des variations ont été confirmées par séquençage Sanger sur ADN génomique (*MRPS5*, *AARS2*, *ALDH1B1*, *MTUS1*, *PPA2*, *CARS2*, *ABC11*) et le séquençage sur ADN

complémentaire doit être effectué pour les mutations introniques afin de détecter d'éventuelles anomalies d'épissage.

Au total, nous pensons à ce jour avoir identifié des mutations dans cinq nouveaux gènes non connus pour causer une atteinte hépatique mitochondriale : *NOX5*, *MRPS5*, *AARS2*, *ALDH1B1* et *MTUS1*. La validation de certaines de ces mutations est en cours et fait l'objet de projets de recherche de plusieurs membres de notre équipe. Nous pensons que d'autres gènes parmi lesquels *GLDC*, *MTHFD1*, *NME4* et *ALDH6A1* dont la vérification en Sanger est en cours pour certaines variations s'ajouteront prochainement à cette liste. Ces résultats soulignent encore une fois l'hétérogénéité génétique des atteintes hépatiques d'origine mitochondriale, puisque chaque gène identifié concerne une seule famille.

L'investigation complète des patients présentant une atteinte hépatique est centrale pour aboutir au diagnostic génétique, avant de réaliser un séquençage exome. L'arbre décisionnel comprend l'étude de la chaîne respiratoire sur le foie et les fibroblastes, puis la recherche de déplétion de l'ADNmt dans le foie. La très grande majorité des patients avec déplétion présente des mutations de *DGUOK*, *POLG*, *MPV17* ou *PEO1* et le séquençage Sanger de ces gènes doit être réalisé en premier lieu. Il n'est cependant pas toujours possible, faute de matériel, de quantifier l'ADNmt sur foie d'autant plus que plusieurs de ces patients ont été étudiés en rétrospectif. C'est pour cette raison que nous avons détecté des mutations *DGUOK* dans un des patients de notre série.

Enfin, il existe de nombreuses causes non mitochondriales d'atteinte hépatique, et l'étude de la chaîne respiratoire est centrale pour orienter le diagnostic. Nous avons été cependant pris en défaut chez les patients 46-47 qui présentaient un déficit modéré de la chaîne respiratoire et une hyperlactacidémie pour un des enfants. Ceci nous a conduits à les inclure dans notre étude, alors que le séquençage exome a identifié une mutation du gène *ABCB11*, qui code pour une pompe à sel biliaire, et dont des mutations ont déjà été rapportées dans des cholestases intrahépatiques.

Nous avons tiré des enseignements pour augmenter les chances de réussite du séquençage exome. Tout d'abord afin d'optimiser les résultats, il est préférable de passer en exome plusieurs enfants atteints d'une même famille, ou des trios. En effet, pour les frères et sœurs 44-45 et 46-47 étudiés en parallèle, un gène a été très rapidement mis en évidence (*MTUS1* pour les patients 44-45 et *ABCB11* dont nous avons parlé ci-dessus pour les patients 46-47).

Combiner le séquençage exome avec une étude de cartographie au préalable pour les familles multiplex est également préférable, puisque la cartographie génétique permet de regarder uniquement les variations présentes dans les régions candidates, et facilite donc l'analyse. Malheureusement, la plupart des patients de notre cohorte sont des cas sporadiques nés de parents non consanguins. Cependant, nous avons pu combiner une cartographie génétique, une étude en transcriptome et un séquençage exome pour les deux familles multiplex KE et CO, mais sans réussir à identifier le gène causal. Cela peut être dû aux autres limitations du séquençage exome. Certaines régions, notamment les régions riches en GC et les exons 1, sont très mal couvertes. De plus, ce séquençage n'est réalisé par définition que sur les exons et les régions introniques flanquantes, nous privant des informations concernant les régions introniques et régulatrices des gènes. Enfin, les remaniements (délétions, insertions, duplications) supérieurs à quelques paires de bases ne peuvent pas être détectés par cette technique. Une solution serait d'effectuer du séquençage du génome entier, afin d'avoir accès aux séquences régulatrices, aux séquences introniques et non traduites. En cas de résultat négatif, des puces d'hybridation permettant de détecter des grands remaniements pourraient également être envisagées.

#### **IV. NOX5, UN NOUVEAU GENE D'ATTEINTE HEPATIQUE MITOCHONDRIALE ?**

Le séquençage exome nous a donc permis d'identifier des mutations dans le gène *NOX5*, codant pour une NADPH oxidase, pour les enfants atteints de 3 familles. Nous nous sommes cependant confrontés à plusieurs difficultés concernant la validation des mutations identifiées dans le gène *NOX5*. En effet, les deux mutations chez la patiente IA1, que nous pensions hétérozygote composite, sont en réalité en cis, à savoir portées par le même allèle. De plus, les patients BI1 et TO1 n'ont qu'une seule mutation hétérozygote, héritée d'un parent sain. Ces mutations sont prédites pour être délétères et touchent différents domaines conservés de la protéine *NOX5* (le domaine Ferric réductase contenant six régions transmembranaire dont deux de liaison du fer, ainsi que les domaines de liaison au NAD et FAD). De plus, elles ont un impact sur l'expression du gène *NOX5*, puisque le taux de transcrit *NOX5* est diminué chez les trois patients à plus de 50% (avec un rapport de 0,02 donné en transcriptome pour la patiente IA1) ainsi que la quantité de la protéine. Tous ces éléments sont en faveur du fait que le deuxième allèle apparemment non muté du gène *NOX5* chez les trois patients porte également une mutation provoquant une baisse de son expression. Tout en recherchant le deuxième événement de mutation, nous avons



voulu valider les mutations par sauvetage phénotypique dans les fibroblastes du patient IA1 qui présente une anomalie d'assemblage de l'ensemble des complexes de la chaîne respiratoire et une diminution de la quantité des ARNr 12S et 16S. La sur-expression de l'ADNc sauvage de *NOX5* restaure bien un assemblage des complexes de la chaîne respiratoire et une quantité d'ARNr 12S et 16S normaux dans les fibroblastes du patient IA1, ce qui nous confirme que *NOX5* est bien le gène responsable de la maladie.

*NOX5* est une protéine de fonction inconnue appartenant à la famille des protéines NADPH oxydase, comprenant 5 isoformes protéiques différentes par leur région N terminale. *NOX5* est la protéine de la famille *NOX* dont la fonction est la moins connue et la moins étudiée, ceci étant probablement dû au fait qu'il n'y a pas de modèle animal, le gène *NOX5* n'étant notamment pas présent chez la souris ou le rat. Ce gène est très faiblement exprimé dans les fibroblastes, son expression étant majoritaire dans les testicules, la rate et les tissus fœtaux (Cheng, Cao et al. 2001; Bedard, Jaquet et al. 2012). Ceci a été une limitation à l'étude de l'expression de *NOX5*, pour le dosage du transcrite par RT-PCR quantitative, et pour la visualisation de la protéine *NOX5* par western-blot.

Nous avons tout de même pu déterminer par des expériences de fractionnement cellulaire que l'isoforme la plus courte  $\epsilon$ , fortement prédite pour avoir un adressage mitochondrial, était bien localisée dans les mitochondries et le cytoplasme. Il est très probable que *NOX5*, protéine montrant le plus de différences avec les autres protéines *NOX*, ait évolué différemment et ait acquis une nouvelle fonction. Une étude réalisée sur des cellules vasculaires a montré que l'isoforme *NOX5 $\epsilon$*  n'avait pas d'activité catalytique de production de ROS (Pandey, Patel et al. 2012). De plus, il a été démontré que plusieurs protéines de fonction connue ou inconnue ont une double localisation, cytosolique et mitochondriale (Yogev and Pines 2010).

Un ensemble de données nous incite à penser que la protéine *NOX5* aurait un rôle de dans la synthèse des protéines codées par le génome mitochondrial. La patiente IA1 présente une anomalie quantitative des complexes I, III, IV et V, et qualitative du complexe V avec la présence d'un sous-complexe de plus bas poids moléculaire, visible dans ses fibroblastes. Ce profil d'assemblage mis en évidence par BN-PAGE est un profil similaire à celui observé pour les patients mutés dans les gènes impliqués dans la traduction mitochondriale *GFM1* (Galmiche, Serre et al. 2012), *MRPL3* (Galmiche, Serre et al. 2011) ou *TSFM* (Vedrenne, Galmiche et al. 2012). On observe bien chez la patiente IA1 un déficit de la traduction de l'ensemble des protéines mitochondriales, observé *in vitro* par marquage à la méthionine [<sup>35</sup>S].

De plus, nous avons observé une diminution de l'abondance des ARNr 12S et 16S et une diminution de la quantité des protéines ribosomales MRPS25 et MRPL3 appartenant respectivement aux sous-unités 12S et 16S du ribosome mitochondrial. Or nous savons que des mutations dans une protéine ribosomale appartenant à une des sous-unités du mitoribosome, comme par exemple MRPL3 (Galmiche, Serre et al. 2011), provoquent une déstabilisation de l'ensemble des deux sous-unités (28S et 39S) du ribosome mitochondrial. Cette même observation dans le cas des mutations de *NOX5* suggère donc fortement que l'anomalie de traduction observée est due à une déstabilisation du ribosome mitochondrial, et donc que la protéine *NOX5* est impliquée dans l'assemblage du ribosome mitochondrial.

Afin de vérifier cette hypothèse, nous prévoyons d'étudier l'assemblage du ribosome mitochondrial en regardant le profil des sous-unités 28S et 39S en gradient de densité de sucrose. S'il y a bien une anomalie d'assemblage du mitoribosome, cela nous amène à penser que la protéine *NOX5* interagirait avec des protéines du ribosome mitochondrial.

Cependant, *NOX5* ne fait probablement pas partie intégrante du ribosome mitochondrial. En effet, le mitoribosome est localisé dans la matrice mitochondriale, or *NOX5* est une protéine transmembranaire, constituée d'un grand domaine avec six régions transmembranaires. *NOX5* pourrait donc participer à la traduction mitochondriale, mais pas de manière directe comme le font les protéines MRP constituant le mitoribosome. Elle serait plutôt impliquée de manière plus indirecte, en faisant par exemple partie d'un complexe de traduction avec le ribosome localisé dans la membrane interne mitochondriale, impliqué dans l'insertion des protéines mitochondriales dans la membrane interne, à la manière des protéines Oxa1L ou Letm1 par exemple.

Nous envisageons également de rechercher des partenaires d'interaction de *NOX5* par des expériences de double hybride, en criblant une banque d'ADNc face à l'ADNc *NOX5*. Identifier les protéines avec lesquelles interagit *NOX5* directement devrait nous permettre de mieux comprendre les mécanismes d'action de cette protéine et son rôle dans la traduction mitochondriale. Dans le cas où nous mettrions en évidence de nouveaux partenaires d'interaction, ces derniers pourraient également être considérés comme de nouveaux gènes candidats à séquencer chez les patients de notre cohorte.

Il nous reste cependant toujours à déterminer les bases génétiques pour les trois patients mutés dans *NOX5* et mettre à l'identification les deuxièmes mutations, que nous n'avons pas mises en

évidence par séquençage exome, séquençage Sanger des CNE, CGH array customisée et séquençage Sanger des régions promotrices et régulatrices de la transcription.

Nous prévoyons donc par la suite d'effectuer le séquençage du génome complet de la région génomique comprenant *NOX5* et 1 Mb de part et d'autre du gène pour les trois individus atteints. Nous recherchons un deuxième événement pour chaque patient localisé dans une région régulatrice, dans les séquences promotrices ou de régulation de la transcription. Cet événement doit être localisé dans une région non codante, étant donné que la séquence codante visualisée par séquençage de l'ADNc ne présente pas d'anomalie qualitative. Même s'il nous semble peu probable que les trois patients soient tous porteurs d'une translocation équilibrée, nous pouvons également réaliser une expérience de peignage moléculaire, afin de détecter des remaniements équilibrés, ce que la technique de CGH array ne nous a pas permis de mettre en évidence.

## V. ATTEINTE HEPATIQUE MITOCHONDRIALE ET TISSU SPECIFICITE

Les atteintes hépatiques mitochondriales isolées représentent un groupe relativement homogène cliniquement. Les atteintes hépatiques syndromiques sont beaucoup plus hétérogènes. Les gènes impliqués jusqu'à présent dans les atteintes hépatiques isolées avec déplétion (*POLG*, *DGUOK*, *PEO1* et *MPV17*) et ceux impliqués dans les atteintes hépatiques sans déplétion de l'ADNmt (*TRMU*, *GFM1* et *TSFM*) sont des gènes impliqués dans des processus primordiaux pour la mitochondrie, tels que la maintenance et la réplication de l'ADNmt (déplétion) ou la traduction des protéines mitochondriales (pas de déplétion). Sachant que les mitochondries sont présentes dans tous les tissus (hormis les hématies), nous pouvons nous demander pourquoi des mutations dans ces gènes provoquent une atteinte limitée au foie et non une atteinte multisystémique. Les mécanismes à l'origine de cette tissu-spécificité sont toujours très mal connus. Il est toutefois possible de donner quelques d'explications, en particulier en ce qui concerne la tissu spécificité des mutations de *DGUOK*. En effet, des mutations du gène *DGUOK* donnent une déplétion de l'ADNmt associée avec une atteinte hépatique, alors que les mutations de *TK2* causent une déplétion touchant le muscle.

Nous rappelons qu'il existe deux désoxynucléotide kinases mitochondriales impliquées dans la voie de récupération mitochondriale des dNTP : *TK2* et *DGUOK*. En cas de déficit de *TK2* et

DGUOK, l'activité des enzymes cytoplasmiques TK1 et dCK peut compenser cette déficience, du fait qu'elles ont la même spécificité identique vis-à-vis de leurs substrats. Or il a été décrit que l'activité de la kinase cytoplasmique dCK est très faible dans le foie et dans le cerveau (Arner and Eriksson 1995; Mandel, Szargel et al. 2001) et que la seconde enzyme cytoplasmique TK1 n'est pas exprimée dans les tissus post-mitotiques comme le muscle et le cerveau (Saada 2004). Les dNTP mitochondriaux de ces tissus sont donc totalement dépendants de la voie mitochondriale de récupération des dNTP. On peut donc imaginer que les atteintes tissu-spécifiques des mutations *DGUOK* ou *TK2* sont dus à une absence de compensation par la synthèse cytosolique. Ainsi, le phénotype d'atteinte hépatique observé dans les déficits en DGUOK pourrait être du à un défaut de compensation par l'enzyme cytosolique dCK dans le foie (Arner and Eriksson 1995; Mandel, Szargel et al. 2001). A l'inverse, le déficit en TK2 conduit à une atteinte musculaire car TK1 n'est pas exprimée dans ce tissu (Arner and Eriksson 1995).

Pour ce qui est des gènes *TRMU*, *GFM1* et *TSFM*, tous acteurs de la traduction mitochondriale, le mécanisme provoquant une atteinte restreinte au foie est toujours inconnu. Il existe probablement des facteurs tissu spécifiques, un environnement cellulaire particulier, faisant que le foie est plus sensible ou représente l'organe touché en premier dans le cas de ces mutations.

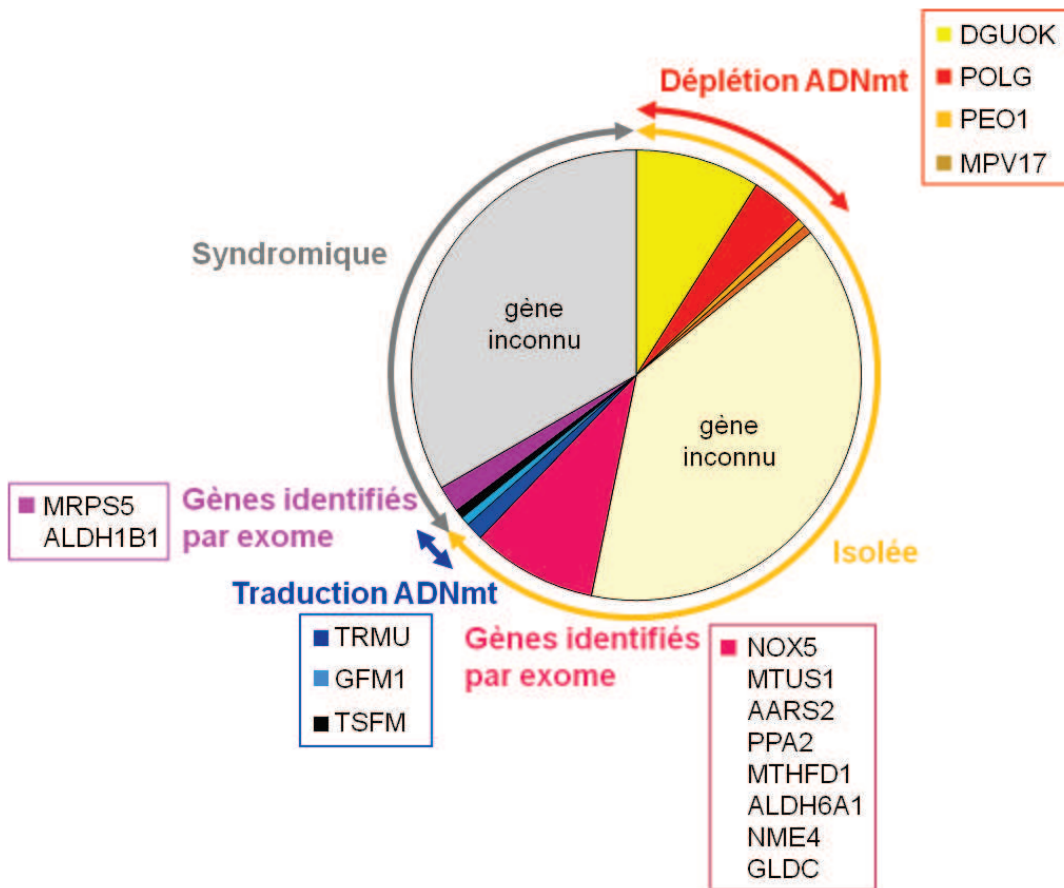
Les mutations des gènes *TRMU*, *GFM1* et *TSFM* sont responsables d'atteintes hépatiques mitochondriales, mais peuvent également donner des phénotypes différents. En effet, les phénotypes associés aux déficits de la traduction mitochondriale ne sont pas homogènes : des mutations touchant des protéines de fonction similaire comme les protéines ribosomales ou les aminoacyl-tRNA synthétases par exemple, ou des mutations touchant un même gène, peuvent conduire à des cliniques différentes (comme pour *GFM1* et *TSFM* par exemple). Ces déficits sont le plus souvent tissu spécifiques, alors que les gènes mutés ont une expression ubiquitaire. Ceci peut être du à des mécanismes de régulation d'expression tels que des promoteurs alternatifs tissu spécifiques, ou à des interactions avec certains facteurs tissus spécifiques, ou encore à des disponibilités en substrats variables selon les tissus. Une régulation temporelle de l'expression génétique peut également intervenir. Une récente étude (Ronchi, Garone et al. 2012) a rapporté le cas d'une patiente mutée dans *DGUOK* ayant une atteinte hépatique et une déplétion dans le foie. Elle a pu être transplantée à 9 mois et a survécu à sa greffe. Une fois le phénotype hépatique résolu, cette patiente a développé par la suite une myopathie mitochondriale avec rhabdomyolyses. Il s'est avéré qu'elle avait des délétions multiples dans le muscle. Ceci nous montre que la tissu spécificité de l'expression d'une mutation peut être due à des contraintes

temporelles, et qu'en traitant l'atteinte d'un organe qui va provoquer la survie de l'individu, cela va alors entraîner l'expression de la mutation dans un tissu différent.

## VI. CONCLUSION

En résumé, parmi notre série d'atteinte hépatique mitochondriale de l'hôpital Necker-Enfants malades, nous avons maintenant pu identifier la cause génétique pour des patients ayant une atteinte hépatique sans déplétion de l'ADNmt, groupe jusqu'à présent non déterminé génétiquement contrairement aux atteintes hépatiques avec déplétion de l'ADNmt. Toutefois, chaque mutation ne concerne que très peu de familles et de patients, et par conséquent seulement 4 de nos patients portent des mutations dans les gènes *GFM1* (1 patient), *TRMU* (2 patients) et *TSFM* (1 patient) tous impliqués dans la traduction des protéines codées par l'ADNmt (Figure 63).

Après la réalisation du séquençage exome, fait pour 38 des 70 patients de notre cohorte atteinte hépatique mitochondriale sans déplétion de l'ADNmt, la proportion des gènes inconnus tend encore à diminuer. Les gènes indiqués sur la Figure 63 sont en attente de validation, mais nous pensons avoir identifié la cause génétique pour 14 patients ayant une forme isolée et 2 patients ayant une forme syndromique. Ce travail a donc permis d'augmenter considérablement le diagnostic génétique de ces maladies puisque le gène en cause a été identifié pour 44% de nos patients maintenant.



**Figure 63 : Répartition des gènes mutés identifiés chez nos patients des hôpitaux Necker-Enfants Malades et du Kremlin-Bicêtre ayant une atteinte hépatique mitochondriale.**

Les atteintes hépatiques mitochondriales se répartissent en deux types de formes : syndromique ou isolée. Notre cohorte est constituée de 139 patients, 22 patients ayant une déplétion de l'ADNmt et 117 n'ayant pas de déplétion majeure de l'ADNmt.

Parmi ces 117 patients, 86 patients ont une forme isolée et 53 une forme syndromique. Pour les formes syndromiques, nous avons identifié 1 patient muté dans le gène TSMF, les autres n'ont pas de gène identifié. Pour les formes isolées, parmi les 22 patients ayant une déplétion de l'ADNmt dans le foie, 14 sont mutés dans le gène DGUOK, 6 dans POLG, 1 dans MPV17 et 1 dans PEO1. Sur les 64 patients restant, nous avons identifié 2 patients mutés dans le gène TRMU et 1 dans le gène GFM1.

Le séquençage exome a révélé la présence de mutations dans les gènes MRPS5 et ALDH1B1 chez 2 patients ayant une forme syndromique et des mutations dans les gènes NOX5, MTUS1, AARS2, PPA2, MTHFD1, ALDH6A1, NME4 et GLDC chez un total de 14 patients ayant une forme isolée.

Les gènes responsables de la pathologie restent encore à être identifiés chez 66% de nos patients ayant une atteinte hépatique mitochondriale sans déplétion de l'ADNmt, et ce malgré toute la difficulté que représente l'hétérogénéité génétique dans ce groupe cliniquement homogène d'atteinte hépatique mitochondriale.

En conclusion, les différentes stratégies mises en place dans ce travail nous ont permis d'avancer dans la caractérisation génétique des atteintes hépatiques mitochondriales sans déplétion de l'ADNmt et d'apporter un diagnostic moléculaire pour certains patients. L'identification de ces gènes est une opportunité unique de compréhension des mécanismes de la traduction mitochondriale, de la spécificité tissulaire de ces pathologies et peut être à terme de la mise au point de thérapeutiques adaptées.

Nous pouvons désormais apporter des éléments de réponse supplémentaires quant aux bases moléculaires des atteintes hépatiques mitochondriales sans déplétion de l'ADNmt, nous permettant de réaliser un conseil génétique plus avisé pour les familles concernées.

*REFERENCES*  
*BIBLIOGRAPHIQUES*

---





- Amati-Bonneau, P., M. L. Valentino, et al. (2008). "OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes." Brain **131**(Pt 2): 338-51.
- Antonicka, H., A. Mattman, et al. (2003). "Mutations in COX15 produce a defect in the mitochondrial heme biosynthetic pathway, causing early-onset fatal hypertrophic cardiomyopathy." Am J Hum Genet **72**(1): 101-14.
- Antonicka, H., E. Ostergaard, et al. (2010). "Mutations in C12orf65 in patients with encephalomyopathy and a mitochondrial translation defect." Am J Hum Genet **87**(1): 115-22.
- Antonicka, H., F. Sasarman, et al. (2006). "The molecular basis for tissue specificity of the oxidative phosphorylation deficiencies in patients with mutations in the mitochondrial translation factor EFG1." Hum Mol Genet **15**(11): 1835-46.
- Arner, E. S. and S. Eriksson (1995). "Mammalian deoxyribonucleoside kinases." Pharmacol Ther **67**(2): 155-86.
- Astuti, D., F. Latif, et al. (2001). "Gene mutations in the succinate dehydrogenase subunit SDHB cause susceptibility to familial pheochromocytoma and to familial paraganglioma." Am J Hum Genet **69**(1): 49-54.
- Bannwarth, S., A. Figueroa, et al. (2012). "The human MSH5 (MutSHomolog 5) protein localizes to mitochondria and protects the mitochondrial genome from oxidative damage." Mitochondrion **12**(6): 654-65.
- Barel, O., Z. Shorer, et al. (2008). "Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRQ." Am J Hum Genet **82**(5): 1211-6.
- Bayat, V., I. Thiffault, et al. (2012). "Mutations in the mitochondrial methionyl-tRNA synthetase cause a neurodegenerative phenotype in flies and a recessive ataxia (ARSAL) in humans." PLoS Biol **10**(3): e1001288.
- Baysal, B. E., R. E. Ferrell, et al. (2000). "Mutations in SDHD, a mitochondrial complex II gene, in hereditary paraganglioma." Science **287**(5454): 848-51.
- Bedard, K., V. Jaquet, et al. (2012). "NOX5: from basic biology to signaling and disease." Free Radic Biol Med **52**(4): 725-34.
- Belostotsky, R., E. Ben-Shalom, et al. (2011). "Mutations in the Mitochondrial Seryl-tRNA Synthetase Cause Hyperuricemia, Pulmonary Hypertension, Renal Failure in Infancy and Alkalosis, HUPRA Syndrome." Am J Hum Genet **88**(2): 193-200.
- Benko, S., C. T. Gordon, et al. (2011). "Disruption of a long distance regulatory region upstream of SOX9 in isolated disorders of sex development." J Med Genet **48**(12): 825-30.
- Bogenhagen, D. F. (1999). "Repair of mtDNA in vertebrates." Am J Hum Genet **64**(5): 1276-81.
- Bogenhagen, D. F., D. Rousseau, et al. (2008). "The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids." J Biol Chem **283**(6): 3665-75.
- Borutaite, V. (2010). "Mitochondria as decision-makers in cell death." Environ Mol Mutagen **51**(5): 406-16.

- Botstein, D. and N. Risch (2003). "Discovering genotypes underlying human phenotypes: past successes for mendelian disease, future approaches for complex disease." Nat Genet **33 Suppl**: 228-37.
- Bourdon, A., L. Minai, et al. (2007). "Mutation of RRM2B, encoding p53-controlled ribonucleotide reductase (p53R2), causes severe mitochondrial DNA depletion." Nat Genet **39**(6): 776-80.
- Bourgeron, T., D. Chretien, et al. (1993). "Expression of respiratory chain deficiencies in human cultured cells." Neuromuscul Disord **3**(5-6): 605-8.
- Bourgeron, T., D. Chretien, et al. (1994). "Mutation of the fumarase gene in two siblings with progressive encephalopathy and fumarase deficiency." J Clin Invest **93**(6): 2514-8.
- Bourgeron, T., P. Rustin, et al. (1995). "Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency." Nat Genet **11**(2): 144-9.
- Bowmaker, M., M. Y. Yang, et al. (2003). "Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone." J Biol Chem **278**(51): 50961-9.
- Brown, T. A., C. Cecconi, et al. (2005). "Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism." Genes Dev **19**(20): 2466-76.
- Bykhovskaya, Y., K. Casas, et al. (2004). "Missense mutation in pseudouridine synthase 1 (PUS1) causes mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA)." Am J Hum Genet **74**(6): 1303-8.
- Calvaruso, M. A., J. Smeitink, et al. (2008). "Electrophoresis techniques to investigate defects in oxidative phosphorylation." Methods **46**(4): 281-7.
- Cameron, J. M., A. Janer, et al. (2011). "Mutations in iron-sulfur cluster scaffold genes NFU1 and BOLA3 cause a fatal deficiency of multiple respiratory chain and 2-oxoacid dehydrogenase enzymes." Am J Hum Genet **89**(4): 486-95.
- Campuzano, V., L. Montermini, et al. (1996). "Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion." Science **271**(5254): 1423-7.
- Carroll, C. J., P. Isohanni, et al. (2013). "Whole-exome sequencing identifies a mutation in the mitochondrial ribosome protein MRPL44 to underlie mitochondrial infantile cardiomyopathy." J Med Genet.
- Casey, J. P., P. McGettigan, et al. (2012). "Identification of a mutation in LARS as a novel cause of infantile hepatopathy." Mol Genet Metab **106**(3): 351-8.
- Chen, X. J., X. Wang, et al. (2005). "Aconitase couples metabolic regulation to mitochondrial DNA maintenance." Science **307**(5710): 714-7.
- Chen, Y., G. Zhou, et al. (2005). "Cloning and functional analysis of human mTERFL encoding a novel mitochondrial transcription termination factor-like protein." Biochem Biophys Res Commun **337**(4): 1112-8.
- Cheng, G., Z. Cao, et al. (2001). "Homologs of gp91phox: cloning and tissue expression of Nox3, Nox4, and Nox5." Gene **269**(1-2): 131-40.

- Chi, Z., L. Nie, et al. (2012). "RecQL4 cytoplasmic localization: implications in mitochondrial DNA oxidative damage repair." Int J Biochem Cell Biol **44**(11): 1942-51.
- Christian, B. E. and L. L. Spremulli (2012). "Mechanism of protein biosynthesis in mammalian mitochondria." Biochim Biophys Acta **1819**(9-10): 1035-54.
- Cizkova, A., V. Stranecky, et al. (2008). "TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy." Nat Genet **40**(11): 1288-90.
- Coenen, M. J., H. Antonicka, et al. (2004). "Mutant mitochondrial elongation factor G1 and combined oxidative phosphorylation deficiency." N Engl J Med **351**(20): 2080-6.
- Croteau, D. L., R. H. Stierum, et al. (1999). "Mitochondrial DNA repair pathways." Mutat Res **434**(3): 137-48.
- de Lonlay, P., I. Valnot, 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**(1): 57-60.
- De Meirleir, L., S. Seneca, et al. (2004). "Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12." J Med Genet **41**(2): 120-4.
- Debray, F. G., M. Lambert, et al. (2008). "Disorders of mitochondrial function." Curr Opin Pediatr **20**(4): 471-82.
- DiMauro, S. (2004). "Mitochondrial diseases." Biochim Biophys Acta **1658**(1-2): 80-8.
- Distelmaier, F., W. J. Koopman, et al. (2009). "Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease." Brain **132**(Pt 4): 833-42.
- Duncan, A. J., M. Bitner-Glindzicz, et al. (2009). "A nonsense mutation in COQ9 causes autosomal-recessive neonatal-onset primary coenzyme Q10 deficiency: a potentially treatable form of mitochondrial disease." Am J Hum Genet **84**(5): 558-66.
- Dunning, C. J., M. McKenzie, et al. (2007). "Human CIA30 is involved in the early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease." Embo J **26**(13): 3227-37.
- Edvardson, S., A. Shaag, et al. (2007). "Deleterious mutation in the mitochondrial arginyl-transfer rna synthetase gene is associated with pontocerebellar hypoplasia." Am J Hum Genet **81**: 857-862.
- Elo, J. M., S. S. Yadavalli, et al. (2012). "Mitochondrial phenylalanyl-tRNA synthetase mutations underlie fatal infantile Alpers encephalopathy." Hum Mol Genet **21**(20): 4521-9.
- Falk, M.J., Zhang, Z., et al. (2008). "Metabolic pathway profiling of mitochondrial respiratory chain mutants in *C. elegans*." Mol Genet Metab **93**(4): 388-97.
- Ferrari, G., E. Lamantea, et al. (2005). "Infantile hepatocerebral syndromes associated with mutations in the mitochondrial DNA polymerase-gammaA." Brain **128**(Pt 4): 723-31.
- Galmiche, L., V. Serre, et al. (2011). "Exome sequencing identifies MRPL3 mutation in mitochondrial cardiomyopathy." Hum Mutat **32**(11): 1225-31.

- Galmiche, L., V. Serre, et al. (2012). "Toward genotype phenotype correlations in GFM1 mutations." Mitochondrion **12**(2): 242-7.
- Ghezzi, D., P. Arzuffi, et al. (2011). "Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies." Nat Genet **43**(3): 259-63.
- Ghezzi, D., E. Baruffini, et al. (2012). "Mutations of the mitochondrial-tRNA modifier MTO1 cause hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis." Am J Hum Genet **90**(6): 1079-87.
- Ghezzi, D., P. Goffrini, et al. (2009). "SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy." Nat Genet.
- Ghezzi, D., A. Saada, et al. (2008). "FASTKD2 nonsense mutation in an infantile mitochondrial encephalomyopathy associated with cytochrome c oxidase deficiency." Am J Hum Genet **83**(3): 415-23.
- Giordano, C., M. Sebastiani, et al. (2008). "Gastrointestinal dysmotility in mitochondrial neurogastrointestinal encephalomyopathy is caused by mitochondrial DNA depletion." Am J Pathol **173**(4): 1120-8.
- Gotz, A., H. Tynismaa, et al. (2011). "Exome sequencing identifies mitochondrial alanyl-tRNA synthetase mutations in infantile mitochondrial cardiomyopathy." Am J Hum Genet **88**(5): 635-42.
- Graziewicz, M. A., M. J. Longley, et al. (2004). "Structure-function defects of human mitochondrial DNA polymerase in autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia." Nat Struct Mol Biol **11**(8): 770-6.
- Gredilla, R. and T. Stevnsner (2012). "Mitochondrial base excision repair assays." Methods Mol Biol **920**: 289-304.
- Guilmatre, A., S. Legallic, et al. (2010). "Type I hyperprolinemia: genotype/phenotype correlations." Hum Mutat **31**(8): 961-5.
- Gustafson, A. W. (2002). "Paternal inheritance of mitochondrial DNA." N Engl J Med **347**(25): 2081-2; author reply 2081-2.
- Haack, T. B., K. Danhauser, et al. (2010). "Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency." Nat Genet **42**(12): 1131-4.
- Haas, R. H., S. Parikh, et al. (2007). "Mitochondrial disease: a practical approach for primary care physicians." Pediatrics **120**(6): 1326-33.
- Haque, M. E., K. B. Elmore, et al. (2010). "Properties of the C-terminal tail of human mitochondrial inner membrane protein Oxa1L and its interactions with mammalian mitochondrial ribosomes." J Biol Chem **285**(36): 28353-62.
- Hatefi, Y. (1985). "The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system." Annu Rev Biochem **54**: 1015-69.
- Haudry, C., P. de Lonlay, et al. (2012). "Maternal uniparental disomy of chromosome 2 in a patient with a DGUOK mutation associated with hepatocerebral mitochondrial DNA depletion syndrome." Mol Genet Metab **107**, 700-704.

- Haut, S., M. Brivet, et al. (2003). "A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis." Hum Genet **113**(2): 118-22.
- He, J., H. M. Cooper, et al. (2012). "Human C4orf14 interacts with the mitochondrial nucleoid and is involved in the biogenesis of the small mitochondrial ribosomal subunit." Nucleic Acids Res **40**(13): 6097-108.
- Heckerling, P. S. (2002). "Paternal inheritance of mitochondrial DNA." N Engl J Med **347**(25): 2081-2; author reply 2081-2.
- Hinson, J. T., V. R. Fantin, et al. (2007). "Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Bjornstad syndrome." N Engl J Med **356**(8): 809-19.
- Holt, I. J., H. E. Lorimer, et al. (2000). "Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA." Cell **100**(5): 515-24.
- Huynen, M. A., I. Duarte et al. (2012). "Structure based hypothesis of a mitochondrial ribosome rescue mechanism." Biol Direct **7**:14.
- Janer, A., H. Antonicka, et al. (2012). "An RMND1 Mutation causes encephalopathy associated with multiple oxidative phosphorylation complex deficiencies and a mitochondrial translation defect." Am J Hum Genet **91**(4): 737-43.
- Juhling, F., M. Morl, et al. (2009). "tRNADB 2009: compilation of tRNA sequences and tRNA genes." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D159-62.
- Kaukonen, J., J. K. Juselius, et al. (2000). "Role of adenine nucleotide translocator 1 in mtDNA maintenance." Science **289**(5480): 782-5.
- Kim, S. J., M. C. Kwon, et al. (2012). "CRIF1 is essential for the synthesis and insertion of oxidative phosphorylation polypeptides in the mammalian mitochondrial membrane." Cell Metab **16**(2): 274-83.
- Lagier-Tourenne, C., M. Tazir, et al. (2008). "ADCK3, an ancestral kinase, is mutated in a form of recessive ataxia associated with coenzyme Q10 deficiency." Am J Hum Genet **82**(3): 661-72.
- Larsen, N. B., M. Rasmussen, et al. (2005). "Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways?" Mitochondrion **5**(2): 89-108.
- Lee, N. C., D. Dimmock, et al. (2009). "Simultaneous detection of mitochondrial DNA depletion and single-exon deletion in the deoxyguanosine gene using array-based comparative genomic hybridisation." Arch Dis Child **94**, 55-58.
- Liesa, M., M. Palacin, et al. (2009). "Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease." Physiol Rev **89**(3): 799-845.
- Lightowers, R. N., P. F. Chinnery, et al. (1997). "Mammalian mitochondrial genetics: heredity, heteroplasmy and disease." Trends Genet **13**(11): 450-5.
- Litonin, D., M. Sologub, et al. (2010). "Human mitochondrial transcription revisited: only TFAM and TFB2M are required for transcription of the mitochondrial genes in vitro." J Biol Chem **285**(24): 18129-33.

- Liu, M. and L. Spremulli (2000). "Interaction of mammalian mitochondrial ribosomes with the inner membrane." J Biol Chem **275**(38): 29400-6.
- Loeffler, M. and G. Kroemer (2000). "The mitochondrion in cell death control: certainties and incognita." Exp Cell Res **256**(1): 19-26.
- Longley, M. J., S. Clark, et al. (2006). "Mutant POLG2 disrupts DNA polymerase gamma subunits and causes progressive external ophthalmoplegia." Am J Hum Genet **78**(6): 1026-34.
- Longley, M. J., R. Prasad, et al. (1998). "Identification of 5'-deoxyribose phosphate lyase activity in human DNA polymerase gamma and its role in mitochondrial base excision repair in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(21): 12244-8.
- Lopez-Martin, J. M., L. Salviati, et al. (2007). "Missense mutation of the COQ2 gene causes defects of bioenergetics and de novo pyrimidine synthesis." Hum Mol Genet **16**(9): 1091-7.
- Lopez, L. C., M. Schuelke, et al. (2006). "Leigh syndrome with nephropathy and CoQ10 deficiency due to decaprenyl diphosphate synthase subunit 2 (PDSS2) mutations." American Journal of Human Genetics **79**(December): 1125-1129.
- Luft, R., D. Ikkos, et al. (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**: 1776-804.
- Mancuso, M., M. Filosto, et al. (2007). "Mitochondrial DNA-related disorders." Biosci Rep **27**(1-3): 31-7.
- Mandel, H., R. Szargel, et al. (2001). "The deoxyguanosine kinase gene is mutated in individuals with depleted hepatocerebral mitochondrial DNA." Nat Genet **29**(3): 337-41.
- Massa, V., E. Fernandez-Vizarra, et al. (2008). "Severe infantile encephalomyopathy caused by a mutation in COX6B1, a nucleus-encoded subunit of cytochrome c oxidase." Am J Hum Genet **82**(6): 1281-9.
- Mayr, J. A., V. Havlickova, et al. (2010). "Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 epsilon subunit." Hum Mol Genet **19**(17): 3430-9.
- Metodieva, M. D., N. Lesko, et al. (2009). "Methylation of 12S rRNA is necessary for in vivo stability of the small subunit of the mammalian mitochondrial ribosome." Cell Metab **9**(4): 386-97.
- Miller, C., A. Saada, et al. (2004). "Defective mitochondrial translation caused by a ribosomal protein (MRPS16) mutation." Ann Neurol **56**(5): 734-8.
- Mochel, F., M. A. Knight, et al. (2008). "Splice mutation in the iron-sulfur cluster scaffold protein ISCU causes myopathy with exercise intolerance." Am J Hum Genet **82**(3): 652-60.
- Mollet, J., A. Delahodde, et al. (2008). "CABC1 gene mutations cause ubiquinone deficiency with cerebellar ataxia and seizures." Am J Hum Genet **82**(3): 623-30.
- Mollet, J., I. Giurgea, et al. (2007). "Prenyldiphosphate synthase, subunit 1 (PDSS1) and OH-benzoate polyprenyltransferase (COQ2) mutations in ubiquinone deficiency and oxidative phosphorylation disorders." J Clin Invest **117**(3): 765-72.

- Montoya, J., D. Ojala, et al. (1981). "Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs." Nature **290**(5806): 465-70.
- Munnich, A., A. Rotig, et al. (1996). "Clinical presentations and laboratory investigations in respiratory chain deficiency." Eur J Pediatr **155**(4): 262-74.
- Munnich, A. and P. Rustin (2001). "Clinical spectrum and diagnosis of mitochondrial disorders." Am J Med Genet **106**(1): 4-17.
- Nagao, A., T. Suzuki, et al. (2009). "Biogenesis of glutaminyl-mt tRNAGln in human mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(38): 16209-14.
- Nakabeppu, Y., D. Tsuchimoto, et al. (2004). "Biological significance of the defense mechanisms against oxidative damage in nucleic acids caused by reactive oxygen species: from mitochondria to nuclei." Ann N Y Acad Sci **1011**: 101-11.
- Niemann, S. and U. Muller (2000). "Mutations in SDHC cause autosomal dominant paraganglioma, type 3." Nat Genet **26**(3): 268-70.
- Nijtmans, L. G., N. S. Henderson, et al. (2002). "Blue Native electrophoresis to study mitochondrial and other protein complexes." Methods **26**(4): 327-34.
- Nishino, I., A. Spinazzola, et al. (1999). "Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder." Science **283**(5402): 689-92.
- Nolden, M., S. Ehses, et al. (2005). "The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria." Cell **123**(2): 277-89.
- O'Brien, T. W. (2002). "Evolution of a protein-rich mitochondrial ribosome: implications for human genetic disease." Gene **286**(1): 73-9.
- Ogilvie, I., N. G. Kennaway, et al. (2005). "A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy." J Clin Invest **115**(10): 2784-92.
- Ostergaard, E. (2008). "Disorders caused by deficiency of succinate-CoA ligase." J Inherit Metab Dis **31**(2): 226-9.
- Ostergaard, E., E. Christensen, et al. (2007). "Deficiency of the alpha Subunit of Succinate-Coenzyme A Ligase Causes Fatal Infantile Lactic Acidosis with Mitochondrial DNA Depletion." Am J Hum Genet **81**(2): 383-7.
- Ostergaard, E., F. J. Hansen, et al. (2007). "Mitochondrial encephalomyopathy with elevated methylmalonic acid is caused by SUCLA2 mutations." Brain.
- Pagliarini, D. J., S. E. Calvo, et al. (2008). "A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology." Cell **134**(1): 112-23.
- Pandey, D., A. Patel, et al. (2012). "Expression and functional significance of NADPH oxidase 5 (Nox5) and its splice variants in human blood vessels." Am J Physiol Heart Circ Physiol **302**(10): H1919-28.
- Papadopoulou, L. C., C. M. Sue, et al. (1999). "Fatal infantile cardioencephalomyopathy with COX deficiency and mutations in SCO2, a COX assembly gene." Nat Genet **23**(3): 333-7.



- Park, C. B., J. Asin-Cayuella, et al. (2007). "MTERF3 is a negative regulator of mammalian mtDNA transcription." Cell **130**(2): 273-85.
- Pierce, S. B., K. M. Chisholm, et al. (2011). "Mutations in mitochondrial histidyl tRNA synthetase HARS2 cause ovarian dysgenesis and sensorineural hearing loss of Perrault syndrome." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(16): 6543-8.
- Quinzii, C., A. Naini, et al. (2006). "A Mutation in Para-Hydroxybenzoate-Polyprenyl Transferase (COQ2) Causes Primary Coenzyme Q10 Deficiency." Am J Hum Genet **78**(2): 345-9.
- Richter, R., J. Rorbach, et al. (2010). "A functional peptidyl-tRNA hydrolase, ICT1, has been recruited into the human mitochondrial ribosome." EMBO J **29**(6):1116-25.
- Riley, L. G., S. Cooper, et al. (2010). "Mutation of the mitochondrial tyrosyl-tRNA synthetase gene, YARS2, causes myopathy, lactic acidosis, and sideroblastic anemia--MLASA syndrome." Am J Hum Genet **87**(1): 52-9.
- Robberson, D. L. and D. A. Clayton (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**(12): 3810-4.
- Ronchi, D., C. Garone, et al. (2012). "Next-generation sequencing reveals DGUOK mutations in adult patients with mitochondrial DNA multiple deletions." Brain **135**(Pt 11): 3404-15.
- Rossmannith, W. (2012). "Of P and Z: mitochondrial tRNA processing enzymes." Biochim Biophys Acta **1819**(9-10): 1017-26.
- Rotig, A. (2011). "Human diseases with impaired mitochondrial protein synthesis." Biochim Biophys Acta **1807**(9): 1198-205.
- Rotig, A., P. de Lonlay, et al. (1997). "Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia." Nat Genet **17**(2): 215-7.
- Rotig, A., J. Mollet, et al. (2007). "Infantile and pediatric quinone deficiency diseases." Mitochondrion **7 Suppl**: S112-21.
- Rotig, A. and A. Munnich (2003). "Genetic features of mitochondrial respiratory chain disorders." J Am Soc Nephrol **14**(12): 2995-3007.
- Rotig, A. and J. Poulton (2009). "Genetic causes of mitochondrial DNA depletion in humans." Biochim Biophys Acta **1792**(12): 1103-8.
- Ruiz-Pesini, E., M. T. Lott, et al. (2007). "An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny." Nucleic Acids Res **35**(Database issue): D823-8.
- Rustin, P., D. Chretien, et al. (1994). "Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies." Clin Chim Acta **228**(1): 35-51.
- Ruzzenente, B., M. D. Metodiev, et al. (2012). "LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs." EMBO J **31**(2): 443-56.
- Saada, A. (2004). "Deoxyribonucleotides and disorders of mitochondrial DNA integrity." DNA Cell Biol **23**(12): 797-806.

- Saada, A., S. Edvardson, et al. (2008). "C6ORF66 is an assembly factor of mitochondrial complex I." Am J Hum Genet **82**(1): 32-8.
- Saada, A., A. Shaag, et al. (2007). "Antenatal mitochondrial disease caused by mitochondrial ribosomal protein (MRPS22) mutation." J Med Genet **44**(12): 784-6.
- Saada, A., A. Shaag, et al. (2001). "Mutant mitochondrial thymidine kinase in mitochondrial DNA depletion myopathy." Nat Genet **29**(3): 342-4.
- Salviati, L., E. Trevisson, et al. (2012). "Haploinsufficiency of COQ4 causes coenzyme Q10 deficiency." J Med Genet **49**(3): 187-91.
- Sarzi, E., S. Goffart, et al. (2007). "Twinkle helicase (PEO1) gene mutation causes mitochondrial DNA depletion." Ann Neurol **62**(6): 579-87.
- Sass, J. O., M. Walter, et al. (2012). "3-Hydroxyisobutyrate aciduria and mutations in the ALDH6A1 gene coding for methylmalonate semialdehyde dehydrogenase." J Inher Metab Dis **35**(3): 437-42.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." Anal Biochem **199**(2): 223-31.
- Scheper, G. C., T. van der Klok, et al. (2007). "Mitochondrial aspartyl-tRNA synthetase deficiency causes leukoencephalopathy with brain stem and spinal cord involvement and lactate elevation." Nat Genet **39**(4): 534-9.
- Schwartz, M. and J. Vissing (2002). "Paternal inheritance of mitochondrial DNA." N Engl J Med **347**(8): 576-80.
- Seibold, S., C. Rudroff, et al. (2003). "Identification of a new tumor suppressor gene located at chromosome 8p21.3-22." Faseb J **17**(9): 1180-2.
- Seidel-Rogol, B. L., V. McCulloch, et al. (2003). "Human mitochondrial transcription factor B1 methylates ribosomal RNA at a conserved stem-loop." Nat Genet **33**(1): 23-4.
- Shadel, G. S. and D. A. Clayton (1997). "Mitochondrial DNA maintenance in vertebrates." Annu Rev Biochem **66**: 409-35.
- Sheridan, C. and S. J. Martin (2010). "Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis." Mitochondrion.
- Smeitink, J., L. van den Heuvel, et al. (2001). "The genetics and pathology of oxidative phosphorylation." Nat Rev Genet **2**(5): 342-52.
- Smeitink, J. A., O. Elpeleg, et al. (2006). "Distinct Clinical Phenotypes Associated with a Mutation in the Mitochondrial Translation Elongation Factor EFTs." Am J Hum Genet **79**(5): 869-77.
- Smirnov, A., N. Entelis, et al. (2011). "Biological significance of 5S rRNA import into human mitochondria: role of ribosomal protein MRP-L18." Genes Dev **25**(12): 1289-305.
- Soleimanpour-Lichaei, H. R., I. Kühl, et al. (2007). "mtRF1a is a human mitochondrial translation release factor decoding the major termination codons UAA and UAG." Mol Cell **27**(5): 745-57.

- Spahr, H., B. Habermann, et al. (2012). "Structure of the human MTERF4-NSUN4 protein complex that regulates mitochondrial ribosome biogenesis." Proc Natl Acad Sci U S A **109**(38): 15253-8.
- Spelbrink, J. N., F. Y. Li, 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**(3): 223-31.
- Spinazzola, A., C. Viscomi, et al. (2006). "MPV17 encodes an inner mitochondrial membrane protein and is mutated in infantile hepatic mitochondrial DNA depletion." Nat Genet **38**(5): 570-5.
- Sprengelli, L. L., A. Coursey, et al. (2004). "Initiation and elongation factors in mammalian mitochondrial protein biosynthesis." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **77**: 211-61.
- Steenweg, M. E., D. Ghezzi, et al. (2012). "Leukoencephalopathy with thalamus and brainstem involvement and high lactate 'LTBL' caused by EARS2 mutations." Brain **135**(Pt 5): 1387-94.
- Strautnieks, S. S., L. N. Bull, et al. (1998). "A gene encoding a liver-specific ABC transporter is mutated in progressive familial intrahepatic cholestasis." Nat Genet **20**(3): 233-8.
- Sue, C. M., C. Karadimas, et al. (2000). "Differential features of patients with mutations in two COX assembly genes, SURF-1 and SCO2." Ann Neurol **47**(5): 589-95.
- Sugiana, C., D. J. Pagliarini, et al. (2008). "Mutation of C20orf7 disrupts complex I assembly and causes lethal neonatal mitochondrial disease." Am J Hum Genet **83**(4): 468-78.
- Suomalainen, A. and P. Isohanni (2010). "Mitochondrial DNA depletion syndromes--many genes, common mechanisms." Neuromuscul Disord **20**(7): 429-37.
- Tomecki, R., A. Dmochowska, et al. (2004). "Identification of a novel human nuclear-encoded mitochondrial poly(A) polymerase." Nucleic Acids Res **32**(20): 6001-14.
- Temperley, R., R. Richter, et al. (2010). "Hungry codons promotes frameshifting in human mitochondrial ribosomes." Science **327**(5963):301.
- Tucker, E. J., S. G. Hershman, et al. (2011). "Mutations in MTFMT underlie a human disorder of formylation causing impaired mitochondrial translation." Cell Metab **14**(3): 428-34.
- Valente, L., V. Tiranti, et al. (2007). "Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu." Am J Hum Genet **80**(1): 44-58.
- Valnot, I., S. Osmond, et al. (2000). "Mutations of the SCO1 gene in mitochondrial cytochrome c oxidase deficiency with neonatal-onset hepatic failure and encephalopathy." Am J Hum Genet **67**(5): 1104-9.
- Valnot, I., J. C. von Kleist-Retzow, et al. (2000). "A mutation in the human heme A:farnesyltransferase gene (COX10) causes cytochrome c oxidase deficiency." Hum Mol Genet **9**(8): 1245-9.
- Van Goethem, G., B. Dermaut, et al. (2001). "Mutation of POLG is associated with progressive external ophthalmoplegia characterized by mtDNA deletions." Nat Genet **28**(3): 211-2.

- Van Goethem, G., P. Luoma, et al. (2004). "POLG mutations in neurodegenerative disorders with ataxia but no muscle involvement." Neurology **63**(7): 1251-7.
- Vedrenne, V., L. Galmiche, et al. (2012). "Mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs results in severe infantile liver failure." J Hepatol **56**(1): 294-7.
- Visapaa, I., V. Fellman, et al. (2002). "GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L." Am J Hum Genet **71**(4): 863-76.
- Vortler, S. and M. Morl (2010). "tRNA-nucleotidyltransferases: highly unusual RNA polymerases with vital functions." FEBS Lett **584**(2): 297-302.
- Walberg, M. W. and D. A. Clayton (1983). "In vitro transcription of human mitochondrial DNA. Identification of specific light strand transcripts from the displacement loop region." J Biol Chem **258**(2): 1268-75.
- Wanschers, B. F., R. Szklarczyk, et al. (2012). "C7orf30 specifically associates with the large subunit of the mitochondrial ribosome and is involved in translation." Nucleic Acids Res **40**(9): 4040-51.
- Wenz, T., C. Luca, et al. (2009). "mTERF2 regulates oxidative phosphorylation by modulating mtDNA transcription." Cell Metab **9**(6): 499-511.
- Weraarpachai, W., H. Antonicka, et al. (2009). "Mutation in TACO1, encoding a translational activator of COX I, results in cytochrome c oxidase deficiency and late-onset Leigh syndrome." Nat Genet **41**(7): 833-7.
- Weraarpachai, W., F. Sasarman, et al. (2012). "Mutations in C12orf62, a factor that couples COX I synthesis with cytochrome c oxidase assembly, cause fatal neonatal lactic acidosis." Am J Hum Genet **90**(1): 142-51.
- Wittig, I., H. P. Braun, et al. (2006). "Blue native PAGE." Nat Protoc **1**(1): 418-28.
- Worriax, V. L., J. M. Bullard, et al. (1997). "Mechanistic studies of the translational elongation cycle in mammalian mitochondria." Biochim Biophys Acta **1352**(1): 91-101.
- Xu, F., C. Morin, et al. (2004). "The role of the LRPPRC (leucine-rich pentatricopeptide repeat cassette) gene in cytochrome oxidase assembly: mutation causes lowered levels of COX (cytochrome c oxidase) I and COX III mRNA." Biochem J **382**(Pt 1): 331-6.
- Yang, M. Y., M. Bowmaker, et al. (2002). "Biased incorporation of ribonucleotides on the mitochondrial L-strand accounts for apparent strand-asymmetric DNA replication." Cell **111**(4): 495-505.
- Yassin, A. S., M. E. Haque, et al. (2011). "Insertion domain within mammalian mitochondrial translation initiation factor 2 serves the role of eubacterial initiation factor 1." Proc Natl Acad Sci USA **108**(10): 3918-3923
- Yasukawa, T., A. Reyes, et al. (2006). "Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand." Embo J **25**(22): 5358-71.
- Yasukawa, T., M. Y. Yang, et al. (2005). "A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA." Mol Cell **18**(6): 651-62.

- Yogev, O. and O. Pines (2010). "Dual targeting of mitochondrial proteins: mechanism, regulation and function." Biochim Biophys Acta **1808**(3): 1012-20.
- Zagryadskaya, E. I., N. Kotlova, et al. (2004). "Key elements in maintenance of the tRNA L-shape." J Mol Biol **340**(3): 435-44.
- Zeharia, A., A. Shaag, et al. (2009). "Acute Infantile Liver Failure Due to Mutations in the TRMU Gene." Am J Hum Genet **85**(3): 401-7.
- Zhang, Y., X. Li, et al. (1996). "Role of the conserved aspartate and phenylalanine residues in prokaryotic and mitochondrial elongation factor Ts in guanine nucleotide exchange." FEBS Lett **391**(3): 330-2.
- Zhu, C., Z. B. Yu, et al. (2011). "DNA hypermethylation of the NOX5 gene in fetal ventricular septal defect." Exp Ther Med **2**(5): 1011-1015.
- Zhu, Z., J. Yao, et al. (1998). "SURF1, encoding a factor involved in the biogenesis of cytochrome c oxidase, is mutated in Leigh syndrome." Nat Genet **20**(4): 337-43.