



HAL
open science

Exploration d'anomalies mitochondriales dans les fibroblastes de patients atteints de déficit dans les voies de biogenèse des centres fer-soufre ou de synthèse de l'acide lipoïque

Elise Lebigot

► **To cite this version:**

Elise Lebigot. Exploration d'anomalies mitochondriales dans les fibroblastes de patients atteints de déficit dans les voies de biogenèse des centres fer-soufre ou de synthèse de l'acide lipoïque. Biochimie [q-bio.BM]. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT : 2019SACLS027 . tel-02910196

HAL Id: tel-02910196

<https://theses.hal.science/tel-02910196>

Submitted on 1 Aug 2020

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.

Exploration d'anomalies mitochondriales dans les fibroblastes de patients atteints de déficit dans les voies de biogenèse des centres fer-soufre ou de synthèse de l'acide lipoïque

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay

préparée à l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS)
et dans le service de Biochimie de l'hôpital de Bicêtre
(Hôpitaux Universitaires-Paris Sud)

École doctorale n°568: signalisations et réseaux intégratifs en biologie (Biosigne)
Spécialité: aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Thèse présentée et soutenue au Kremlin-Bicêtre

le 31 janvier 2019

par

Elise Lebigot épouse Chaudry

Composition du Jury

Dr Hélène PUCCIO Directeur de Recherche, Inserm (IGBMC)	Rapporteur
Dr Manuel SCHIFF Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier, Université Paris-Diderot (Inserm UMR_S1163)	Rapporteur
Pr Patrice THEROND Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris-Sud-Paris Saclay (Lip-Sys ²)	Président du jury
Pr Pascale de LONLAY Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Paris-Descartes (Inserm UMR_S1163)	Examineur
Pr Stéphane ALLOUCHE Professeur des Universités-Praticien Hospitalier, Université Caen Basse-Normandie (EA 4650)	Examineur
Dr Cécile BOUTON Directeur de Recherche, CNRS (ICSN, UPR 2301)	Directeur de thèse
Dr Marie-Pierre GOLINELLI Chargé de Recherche, CNRS (ICSN, UPR 2301)	Co-Directeur de thèse
Dr Audrey BOUTRON Praticien Hospitalier, Hôpital de Bicêtre	Co-encadrant

Remerciements

Je remercie Madame le Docteur Hélène PUCCIO et Monsieur le Docteur Manuel SCHIFF pour l'attention qu'ils ont portée à mon travail en acceptant d'en être les rapporteurs.

Je remercie Monsieur le Professeur Patrice THEROND d'avoir accepté de présider ce jury et de m'avoir permis d'effectuer ce travail de thèse au sein de son service. Je le remercie également pour son soutien et ses conseils depuis mon arrivée dans le service de biochimie de l'hôpital Bicêtre il y a 6 ans.

Je remercie Madame le Professeur Pascale de LONLAY d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse auquel sa collaboration a été essentielle.

Je remercie Monsieur le Professeur Stéphane ALLOUCHE d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse et de m'avoir donné le goût de la biochimie il y a dix ans, pendant mon internat au CHU de Caen

Je remercie Madame le Docteur Cécile BOUTON d'avoir accepté de m'encadrer pour ce travail et de m'avoir accueillie au sein de l'équipe.

Je remercie Madame le Docteur Marie-Pierre GOLINELLI pour son investissement dans l'encadrement de ma thèse. Ses conseils et son optimisme dans chaque étape m'ont été d'une grande aide, malgré les difficultés rencontrées.

Je remercie Madame le Docteur Audrey BOUTRON de m'avoir proposé de réaliser cette thèse et de l'avoir encadrée aux côtés de Marie-Pierre et Cécile. Ses encouragements, ses conseils et son expérience m'ont beaucoup apporté que ce soit pour cette thèse et pour mon métier de biologiste. La PDH n'a presque plus de secrets pour moi !

Je remercie les médecins et les familles des patients qui ont accepté que je réalise ces travaux de recherche.

Mes remerciements s'adressent à l'ensemble de l'équipe 34 de l'ICSN notamment Monsieur Jean-Claude DRAPIER, pour ses conseils, et Madame Sylvie RIQUIER pour son aide et ses conseils techniques ainsi que ses encouragements tout au long de ce travail.

Je remercie également Madame Ioana FERECATU qui m'a initiée à la technique de l'immunofluorescence avec Madame Anaïs WAKS au sein de l'unité Inserm UMR-S1139 (Université Paris-Descartes). Je remercie également leur directeur d'unité, Monsieur Thierry FOURNIER de m'avoir accueillie pour suivre cette formation.

Je remercie chaleureusement Monsieur Marc LOMBES, directeur de l'unité Inserm U1185 et UMS-32 de son aide précieuse dans l'immortalisation des cellules et de m'avoir permis d'utiliser le microscope à fluorescence au sein de cette unité. Je remercie également Monsieur Larbi LAMAZIT pour ses conseils et son aide technique pour la technique d'immunofluorescence.

Mes sincères remerciements sont adressés à l'ensemble de personnel du service de biochimie de l'hôpital Bicêtre, que ce soient les techniciens des cultures cellulaires, du secteur MHM et de biologie moléculaire pour leur aide technique, les techniciens de biochimie usuelle pour leurs encouragements et bien sûr l'ensemble des biologistes du service pour leur soutien sans faille, leur optimisme et leur flexibilité dans les plannings au cours des périodes tendues de ma thèse !

Un grand merci à Mademoiselle Allison CARDOSO pour son aide technique.

Je remercie tout particulièrement Monsieur Abdel SLAMA pour ses conseils très précieux, notamment dans la réalisation des western-blot souvent capricieux, et pour son aide durant ces 3 années de thèse. Tu vas drôlement nous manquer !!
Je remercie également Madame Pauline GAINARD pour son soutien, ses relectures et ses conseils tout au long de ce travail de thèse ...



Mes derniers remerciements sont adressés à ma famille, notamment ma maman et ma sœur Clarisse pour leur soutien permanent et leurs séances de baby-sitting qui m'ont permis d'avoir du temps pour travailler !

Merci à Makhdum et à mes deux autres petits amours, Ezan et Emna, pour leur patience depuis plusieurs mois afin de mener à bien cette thèse.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	6
LISTE DES FIGURES	8
LISTE DES TABLEAUX.....	10
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	11
1 DYNAMIQUE ET FONCTIONS MITOCHONDRIALES.....	12
1.1 Structure et dynamique mitochondriale	12
1.2 Fonctions mitochondriales.....	14
1.2.1 Synthèse d'ATP : oxydations phosphorylantes	15
1.2.2 Rôle de la mitochondrie dans le métabolisme des ROS	24
1.2.3 Synthèse de l'hème	29
2 LES PROTEINES A CENTRES FER-SOUFRE.....	31
2.1 Structure et fonctions des centres Fer-Soufre	31
2.1.1 Structure.....	31
2.1.2 Fonctions des centres fer-soufre.....	32
2.2 Biogenèse mitochondriale des protéines à centre Fe-S.....	35
2.2.1 Première étape : synthèse de novo d'un centre [2Fe-2S] sur la protéine échafaud ISCU	36
2.2.2 Deuxième étape : transfert du centre [2Fe-2S].....	38
2.2.3 Troisième étape : voies de maturation des protéines mitochondriales à centre Fe-S	40
3 LES PROTEINES LIPOYLEES : CETO-ACIDE DESHYDROGENASES ET LE SYSTEME DE CLIVAGE DE LA GLYCINE.....	47
3.1 L'acide lipoïque.....	48
3.1.1 Structure et fonctions.....	48

3.1.2	Synthèse de l'acide lipoïque	49
3.2	Les céto-acide déshydrogénases et le système de clivage de la glycine.....	53
3.2.1	Le complexe PDHc.....	55
3.2.2	Les complexes KGDHC, BCKDHc et OADHc	56
3.2.3	Le système de clivage de la glycine	58
4	PATHOLOGIES LIEES A UN DEFICIT DANS LA VOIE DE SYNTHESE DE L'ACIDE LIPOÏQUE OU DE LA BIOGENESE DES PROTEINES FE-S	59
4.1	Anomalies dans la voie de lipoylation des protéines.....	60
4.2	Anomalies dans la voie de biogenèse des protéines Fe-S.....	61
4.2.1	Déficits dans les étapes précoces de biogenèse mitochondriale des centres Fe-S.....	61
4.2.2	Déficits dans les étapes tardives de maturation des protéines [4Fe-4S] mitochondriales	63
	OBJECTIFS DE TRAVAIL.....	67
	MATERIELS ET METHODES.....	69
1	PRODUITS	70
2	CULTURE ET TRAITEMENTS DE CELLULES	72
2.1	Origine des cellules.....	72
2.2	Culture des cellules.....	72
2.3	Traitements des cellules	72
2.4	Immortalisation des cellules	73
3	ETUDE DU RESEAU MITOCHONDRIAL ET DE L'ACIDE LIPOÏQUE PAR IMMUNOFLUORESCENCE DANS LES FIBROBLASTES ET MYOBLASTES.....	75
3.1	Ensemencement des cellules	75
3.2	Fixation des cellules.....	75

3.3	Marquage cellulaire de l'acide lipoïque	76
3.4	Marquage des noyaux cellulaires.....	76
4	EXTRACTIONS PROTEIQUES	77
4.1	Extraits protéiques totaux (homogénats).....	77
4.2	Fractions enrichies en mitochondries.....	78
4.3	Dosage des protéines avec le réactif Bradford	79
5	MESURE DE LA CONSOMMATION D'O₂ PAR POLAROGRAPHIE.....	80
6	MESURE DES ACTIVITES ENZYMATIQUES	81
6.1	Complexes de la CRM	81
6.1.1	Complexe I	81
6.1.2	Complexe II	82
6.1.3	Complexe III	82
6.1.4	Complexe IV.....	83
6.2	Enzymes du cycle de Krebs.....	83
6.2.1	Aconitase mitochondriale.....	83
6.2.2	Complexe KGDHc	83
6.2.3	Citrate synthase	84
7	IMMUNOBLLOT ET BN-PAGE.....	84
7.1	Immunoblot.....	84
7.2	BN-PAGE	86
8	DOSAGE DE METABOLITES IMPLIQUES DANS L'HOMEOSTASIE REDOX.....	87
8.1	Dosage du GSH	87
8.2	Dosage du malondialdéhyde.....	88

RESULTATS ET DISCUSSION 89

1 ETUDE D'ANOMALIES DE PROTEINES MITOCHONDRIALES SUR LES FIBROBLASTES DE PATIENTS DEFICITAIRES EN FDX1L, IBA57, ISCA2, BOLA3, NFU1, LIPT1 ET LIPT2 90

1.1 Article : "Impact of mutations within the [Fe-S] cluster or the lipoic acid biosynthesis pathways on mitochondrial protein expression profiles in fibroblasts from patients" 91

1.2 Résultats complémentaires..... 92

1.2.1 Le complexe IV est affecté par le déficit en LIPT2 et en IBA57, ISCA2, BOLA3 et NFU1, protéines de la voie de maturation des protéines Fe-S..... 92

1.2.2 L'immortalisation des fibroblastes ne modifie pas leur profil biochimique mitochondrial 94

1.2.3 Le réseau mitochondrial n'est pas modifié dans les fibroblastes de patients atteints de déficit en IBA57, ISCA2, BOLA3 et NFU1, 97

1.3 Discussion 100

2 ETUDE DE L'EFFET D'UNE SUPPLEMENTATION EN ACIDE LIPOÏQUE SUR LES FIBROBLASTES IMMORTALISES DE PATIENTS DEFICITAIRES EN BOLA3, NFU1, IBA57 OU ISCA2..... 102

2.1 La supplémentation en acide lipoïque ne restaure pas les activités des complexes I, II et IV de la CRM ni de KGDHc..... 103

2.2 Le niveau de stress oxydatif n'est pas augmenté dans les fibroblastes des patients 109

2.3 Discussion 113

3 EXPLORATION DES ANOMALIES MITOCHONDRIALES CHEZ UN PATIENT DEFICITAIRE EN ISCA1 116

3.1 Présentation clinique et données préliminaires..... 116

3.2 Le déficit en ISCA1 affecte la fonctionnalité de la CRM par déficit des complexes I et II..... 119

3.3 Le déficit en ISCA1 affecte essentiellement les protéines [4Fe-4S]..... 123

3.4	Le réseau mitochondrial n'est pas affecté par le déficit en ISCA1.....	125
3.5	La protéine IBA57 est augmentée dans les cellules déficitaires en ISCA1, alors que la protéine ISCA1 augmente dans les cellules déficitaires en ISCA2.....	127
3.6	Discussion	128
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....		133
ANNEXES.....		143
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		145

Liste des abréviations

Acétyl-CoA : acétyl-coenzyme A
ACP : *acyl carrier protein*
ADN : acide désoxyribonucléique
ADNmt : ADN mitochondrial
ALA : acide delta-aminolévulinique
AMP : adénosine monophosphate
ARNm/ARNt : acide ribonucléique messenger/acide ribonucléique de transfert
ATP : adénosine triphosphate
BCKDHC : *branch chain keto-acid dehydrogenase complex*
BN-PAGE : *blue native-polyacrylamide gel electrophoresis*
CIA : *cytosolic iron-sulfur cluster assembly*
CoA/CoA-SH : coenzyme A lié/libre
CoQ/CoQH₂ : coenzyme Q oxydé/réduit
COX : cytochrome C oxydase (complexe IV)
CRM : chaîne respiratoire mitochondriale
Cyt b, c, c1 : cytochrome b, c, c1
DHLA : *dihydrolipoic acid* (acide lipoïque sous forme réduite)
DRP1 : *dynamine related protein 1*
FAD/FADH₂ : flavine adénine dinucléotide oxydé/réduit
Fe-S : fer-soufre
FMN : flavine mononucléotide
FXN : frataxine
GCS : *glycine cleavage system*
GLRX ou GRX : glutarédoxine
GPX : glutathion peroxydase
GSH/GSSG : glutathion réduit/oxydé
GTP : guanosine triphosphate
H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène
IRE : *iron responsive element*
IRM : imagerie à résonance magnétique
IRP-1 : *iron regulatory protein 1*
KGDHC : *ketoglutarate dehydrogenase complex*
LCR : liquide céphalo-rachidien
LIAS : *lipoic acid synthase*

LM : laurylmaltoside
MCCP : *meta-carbonylcyanide chlorophenylhydrazone*
MDA : malondialdéhyde
MFN : mitofusine
MMDS : *multiple mitochondrial dysfunctions syndrome* (syndrome de dysfonctionnement mitochondrial multiple)
MPA : *metaphosphoric acid*
MPC : *mitochondrial pyruvate carrier*
Mt-aconitase : aconitase mitochondriale
NAC : N-acétyl-cystéine
NAD⁺/NADH : nicotinamide dinucléotide oxydé/réduit
NGS : *next generation sequencing*
OADHc : *oxoadipate dehydrogenase complex*
O₂⁻ : anion superoxyde
OPA1 : *optic atrophy type 1*
OXPHOS : oxydations phosphorylantes de la chaîne respiratoire mitochondriale
PBS : *phosphate buffered saline solution*
PCR : *polymerase chain reaction*
PDHc : *pyruvate dehydrogenase complex*
PFA : paraformaldéhyde
PRX/PRX-SOx : peroxyrédoxine / sulfoperoxyrédoxine
PRX-2Cys : peroxyrédoxines à 2 résidus cystéine
RET : *reverse electron transfert*
ROS : *reactive oxygen species*
SAM : S-adénosyl-méthionine
SDH : succinate déshydrogénase
SDS : *sodium dodecylsulfate*
SOD : superoxyde dismutase
TBAR : *thiobarbituric acid reaction*
THF : tétrahydrofolate
TIM : *transporter inner membrane*
TOM : *transporter outer membrane*
TPP : thiamine pyrophosphate

Liste des figures

Figure 1: Représentation schématique de la dynamique mitochondriale : équilibre entre fusion et fission...	13
Figure 2: Modulation de la morphologie mitochondriale par les apports métaboliques.	14
Figure 3: Origine des coenzymes réduits NADH et FADH ₂ dans la mitochondrie à partir du catabolisme des acides gras et du glucose.....	16
Figure 4 : Représentation schématique du transfert d'électrons associé au couplage de protons entre les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.....	17
Figure 5 : Modèle structural du noyau du complexe I des mammifères formé de 14 sous-unités.....	18
Figure 6 : Structure du complexe II chez les mammifères.....	20
Figure 7 : Structure du complexe III chez les mammifères.....	21
Figure 8 : Structure et fonction du complexe IV chez les mammifères.....	22
Figure 9 : Représentation schématique des principaux sites de production des ROS par les complexes I, III et IV de la CRM et par la sous-unité E3 du complexe KGDHc.....	26
Figure 10 : Principales voies de détoxification des ROS dans la mitochondrie.....	28
Figure 11: Structures des centres fer-soufre.....	31
Figure 12: Activité catalytique des enzymes à radical SAM.	33
Figure 13 : Schéma général de la biogenèse des centres Fe-S chez les eucaryotes.....	36
Figure 14 : Synthèse <i>de novo</i> du centre [2Fe-2S] sur la protéine échafaud ISCU.....	37
Figure 15 : Transfert du centre [2Fe-2S] depuis holo-ISCU à GLRX5 ou à une protéine LYR.....	39
Figure 16: Voies de maturation des protéines [2Fe-2S] mitochondriales.....	42
Figure 17 : Protéines impliquées dans la maturation des protéines Fe-S mitochondriales.	43
Figure 18 : Formation d'un centre [4Fe-4S] au sein du dimère ISCA2/ISCA1 à partir de deux molécules d'holo-GRX5.....	44
Figure 19 : Modélisation de la protéine holo-NFU1 formée de 3 dimères (rouge, vert et bleu), portant chacun un centre [4Fe-4S].....	46
Figure 20 : Localisation des céto-acide déshydrogénases au sein de leurs voies métaboliques.	48
Figure 21 : Structure de l'acide lipoïque sous sa forme oxydée (LA) et réduite (DHLA).....	49
Figure 22 : Synthèse et recyclage de l'acide lipoïque chez les procaryotes.....	50
Figure 23 : Synthèse de l'acide lipoïque chez l'Homme.	53
Figure 24 : Structure et réactions de décarboxylation oxydative des céto-acide déshydrogénases.	54
Figure 25 : Modélisation du complexe PDHc avec 48 sous-unités E2 associées à 12 sous-unités E3BP.	56
Figure 26 : Structure et fonctions du GCS.	58
Figure 27 : Etude des complexes I, II, III et IV par BN-PAGE dans les fibroblastes de 13 patients.....	92
Figure 28 : Comparaison des activités enzymatiques d'enzymes du cycle de Krebs et de complexes de la CRM des fibroblastes avant et après immortalisation.	96

Figure 29 : Réseau mitochondrial observé par microscopie à fluorescence dans les fibroblastes des patients P4 (BOLA3), P8 (NFU1), P10 (IBA57) et P12 (ISCA2).....	99
Figure 30 : Activités enzymatiques des complexes de la CRM et d'enzymes du cycle de Krebs dans les fibroblastes témoins supplémentés en acide lipoïque.	104
Figure 31 : Activités enzymatiques des complexes de la CRM et d'enzymes du cycle de Krebs dans les fibroblastes du patient BOLA3 supplémentés en acide lipoïque.....	105
Figure 32 : Activités enzymatiques des complexes de la CRM et d'enzymes du cycle de Krebs dans les fibroblastes du patient NFU1 supplémentés en acide lipoïque.....	106
Figure 33 : Activités enzymatiques complexes de la CRM et d'enzymes du cycle de Krebs dans les fibroblastes du patient ISCA2 supplémentés en acide lipoïque.....	107
Figure 34 : Formation des Prx-SO _x à partir de Prx-2Cys en présence d'H ₂ O ₂ et voie de réduction des Prx-SO _x	110
Figure 35 : Détection des Prx-SO ₃ et des Prx-2Cys dans les fibroblastes des patients P4 (BOLA3) et P8 (NFU1)	111
Figure 36 : Quantité de MDA détectée dans les fibroblastes des patients déficitaires en BOLA3 (P4), NFU1 (P8), IBA57 (P10), ISCA2 (P12)	112
Figure 37 : Représentation schématique de la mutation p.Tyr101Cys identifiée chez le patient ISCA1.	119
Figure 38 : Mesure de la consommation en O ₂ dans les fibroblastes et les myoblastes du patient ISCA1 en présence de pyruvate, de malate ou de succinate.....	120
Figure 39 : Activités enzymatiques relatives des complexes de la CRM, de la citrate synthase et de KGDHc dans les fibroblastes et les myoblastes du patient ISCA1.	121
Figure 40 : Etude par BN- PAGE de l'intégrité des complexes I, II, III et IV de la CRM dans les fibroblastes du patient ISCA1.	122
Figure 41 : Etude par immunoblot de protéines lipoylées dans les fibroblastes des patients ISCA1, IBA57 et NFU1.....	123
Figure 42 : Localisation de l'acide lipoïque en microscopie à fluorescence dans les fibroblastes du patient ISCA1.	124
Figure 43 : Immunoblot de protéines mitochondriales à centre Fe-S et de sous-unités de complexes de la CRM ne portant pas de centre Fe-S dans les fibroblastes du patient ISCA1.....	125
Figure 44 : Réseau mitochondrial observé par microscopie à fluorescence dans les fibroblastes du patient ISCA1.	126
Figure 45 : Immunoblot des protéines ISCA1, ISCA2 et IBA57 dans les fibroblastes de patients ayant un déficit en ISCA1, en ISCA2 ou en IBA57.	127
Figure 46 : Modèle proposant le positionnement des protéines IBA57, ISCA1, ISCA2, BOLA3,et NFU1 dans la maturation des protéines [4Fe-4S] mitochondriales.	142

Liste des tableaux

Tableau 1 : Cofacteurs des sous-unités hydrophiles du noyau du complexe I chez les mammifères.....	19
Tableau 2 : Enzymes impliquées dans la synthèse de l'acide lipoïque selon les espèces.....	52
Tableau 3 : Présentation clinique, radiologique et biologique des déficits dans la voie de lipoylation de protéines décrits au début de mon travail de thèse en 2015.....	60
Tableau 4 : Pathologies causées par une anomalie dans une protéine impliquée dans la synthèse <i>de novo</i> du centre [2Fe-2S] ou dans le transport du centre [2Fe-2S] vers l'apo-protéine cible, décrites au début de mon travail de thèse en 2015.....	62
Tableau 5 : Pathologies associées à un déficit dans la voie d'assemblage et de transport du centre [4Fe-4S] aux apo-protéines cibles mitochondriales décrites au début de mon travail de thèse en 2015... ..	65
Tableau 6 : Séquence des amorces utilisées pour la PCR et le séquençage des exons d'intérêt à partir de l'ADN total extrait des fibroblastes immortalisés des 4 patients P4, P8, P10 et P12.	74
Tableau 7 : Variations des conditions de réalisation et de conservation des fractions de cellules enrichies en mitochondries selon la technique utilisée.	79
Tableau 8 : Dilution et espèce de production des anticorps primaires utilisés pour la détection des protéines par immunoblot.	86
Tableau 9 : Anticorps utilisés pour la détection des complexes de la CRM par Blue-Native PAGE	87
Tableau 10 : Gène muté responsable de la pathologie des 13 patients inclus dans ce manuscrit.	91
Tableau 11 : Mesure de la consommation en O ₂ et des activités des complexes II à IV de la CRM, d'enzymes du cycle de Krebs et de PDHc dans les fibroblastes du patient ISCA1.	118
Tableau 12 : Génotype et résumé clinique des différents patients avec mutation dans le gène <i>ISCA1</i>	128

CHAPITRE 1 :

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

1 Dynamique et fonctions mitochondriales

1.1 Structure et dynamique mitochondriale

Les mitochondries sont des organelles cytosoliques issu de l'endosymbiose de protéobactéries au sein d'une cellule procaryote (Archibald 2015). Comme leurs ancêtres bactériens, les mitochondries possèdent une double membrane (membranes externe et interne mitochondriales). La membrane interne délimite la matrice mitochondriale. L'espace localisé entre les deux membranes est appelé espace interne mitochondrial ou espace intermembranaire. La membrane interne forme des replis dans la matrice, appelés « crêtes mitochondriales », sur lesquels sont ancrés les complexes de la chaîne respiratoire réalisant les oxydations phosphorylantes. Les protéines mitochondriales sont codées par le génome mitochondrial circulaire (ADNmt) et le génome nucléaire. L'ADNmt est une molécule d'ADN circulaire de 16,6 kbases qui contient 37 gènes codant 13 sous-unités de complexes de la chaîne respiratoire, 22 ARNt mitochondriaux et 2 mitoribosomes (Alston et al. 2017). Les protéines synthétisées dans le cytosol ont, quant à elles, une séquence d'adressage mitochondrial N-terminal spécifique de 15 à 70 résidus. Cette séquence est reconnue par une chaperone dédiée qui va adresser la protéine à une machinerie spécifique de l'import mitochondrial composée de translocases sur les membranes interne et externe et de machineries d'assemblage de type TIM et TOM (Chacinska et al. 2009). L'import dans la mitochondrie nécessite le clivage de la séquence d'adressage pour former la protéine mature mitochondriale (Voet & Voet 1995).

Au sein de la cellule, les mitochondries ne sont pas des organelles isolées les unes des autres mais elles forment un réseau dynamique. La forme et la distribution du réseau mitochondrial résultent d'un équilibre entre les activités de division (fission) et de fusion mitochondriale, avec une morphologie du réseau propre à chaque tissu (Figure 1).

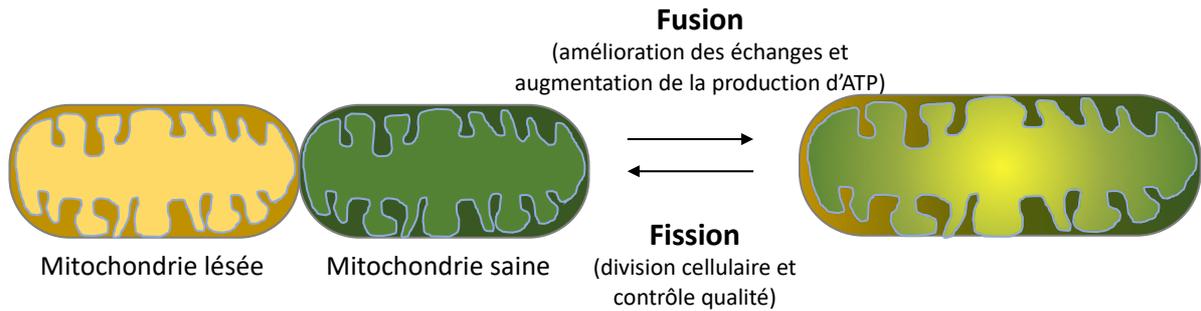


Figure 1: Représentation schématique de la dynamique mitochondriale : équilibre entre fusion et fission.

Adapté d'après (Youle & van der Bliek 2012)

La fission et la fusion mitochondriales jouent aussi un rôle critique dans le maintien des fonctions mitochondriales lors d'un stress environnemental ou métabolique. La fusion mitochondriale permet un échange de métabolites ou d'acides nucléiques entre les mitochondries saines et endommagées, réalisant ainsi une complémentation (au niveau de l'ADNmt, des lipides ou des protéines) de la mitochondrie lésée par la mitochondrie saine. La fusion est donc stimulée par des conditions de stress ou un défaut énergétique et permet d'augmenter les capacités des oxydations phosphorylantes (Youle & van der Bliek 2012). La fission assure le contrôle qualité des mitochondries en facilitant la mitophagie, voie cellulaire permettant l'élimination des mitochondries endommagées. La fission est également essentielle à la séparation des mitochondries lors de la division cellulaire (Zemirli et al. 2018). Ainsi, la morphologie du réseau mitochondrial varie selon les conditions énergétiques et l'homéostasie rédox de la cellule (Figure 2) (Wai & Langer 2016).

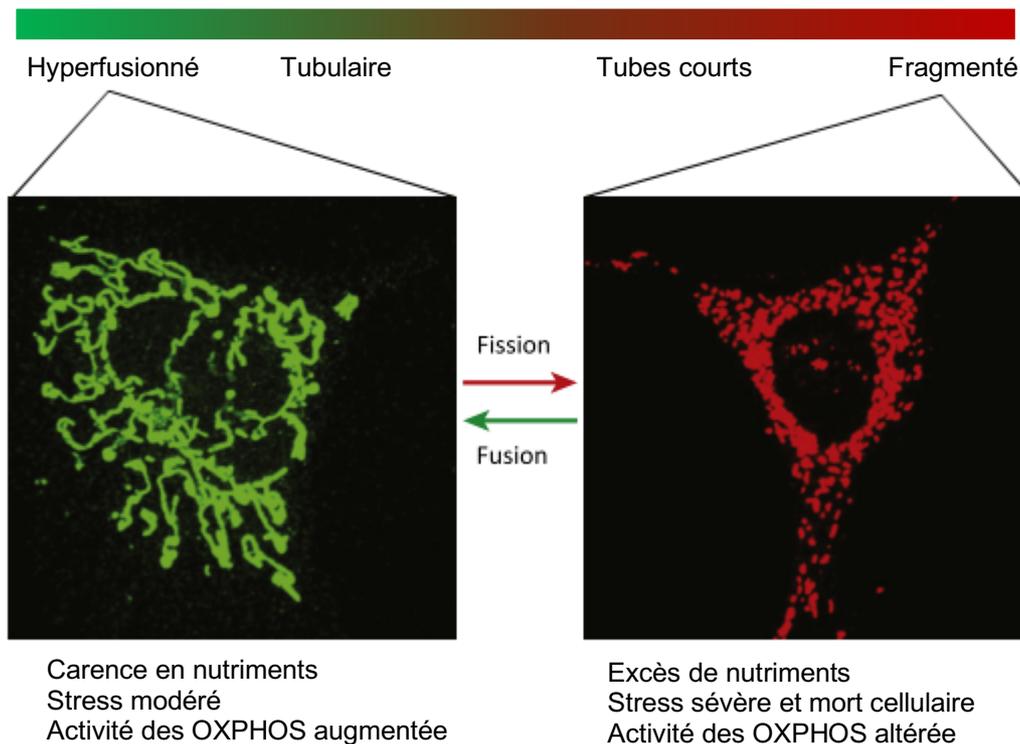


Figure 2: Modulation de la morphologie mitochondriale par les apports métaboliques.

La morphologie des mitochondries peut fortement varier et est influencée par les stimuli métaboliques dans les cellules en culture (fibroblastes embryonnaires de souris) pour adopter une morphologie hyperfusionnée (en vert) ou fragmentée (rouge). Adapté d'après (Wai & Langer 2016). OXPHOS : oxydations phosphorylantes

La fusion et la fission sont médiées par des protéines appartenant à la superfamille des GTPases. Parmi elles, DRP1 (*dynamin-related protein 1*) est une protéine cytosolique hautement régulée impliquée dans la fission. La porine FIS-1 située sur la membrane externe mitochondriale recrute DRP1 pour induire la fission. Quant au processus de fusion, il requiert l'action des mitofusines de types 1 et 2 (MFN1 et MFN2) et de la protéine OPA1 (*optic atrophy type 1*) qui sont impliquées respectivement dans la fusion des membranes externe et interne mitochondriales (Kanamaru et al. 2012).

1.2 Fonctions mitochondriales

La mitochondrie est impliquée dans de nombreux processus essentiels à la cellule tels que le métabolisme énergétique (synthèse d'ATP, oxydation des acides

gras et du pyruvate), l'homéostasie calcique et le métabolisme des acides aminés et des lipides. Elle joue également un rôle central dans l'apoptose. Pour finir, la mitochondrie contribue à la production des espèces réactives de l'oxygène (ou *reactive oxygen species* ROS) mais aussi à la régulation du niveau de ces dernières.

La mitochondrie a également un rôle prépondérant dans le métabolisme du fer cellulaire puisqu'elle participe à la synthèse de l'hème et est le lieu de l'assemblage des groupements prosthétiques fer-soufre (Fe-S). La biogenèse des centres Fe-S mitochondriaux nécessite une machinerie protéique complexe qui sera détaillée dans la deuxième partie de cette introduction. Les protéines à centres Fe-S sont impliquées dans de nombreuses voies métaboliques notamment le métabolisme énergétique mitochondrial. Ainsi, les complexes I, II et III de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM) possèdent plusieurs sous-unités protéiques Fe-S. Parmi les enzymes du cycle de Krebs, l'aconitase mitochondriale (mt-aconitase) et la sous-unité SDHB de la succinate déshydrogénase sont également des enzymes à centres Fe-S. Enfin, la *lipoic acid synthase* (LIAS) est une autre enzyme mitochondriale à centre Fe-S qui intervient dans la synthèse de l'acide lipoïque. La voie métabolique de l'acide lipoïque sera présentée dans la troisième partie de cette introduction.

1.2.1 Synthèse d'ATP : oxydations phosphorylantes

La synthèse d'ATP est le résultat de l'action couplée des cinq complexes de la CRM (complexes I à V) ancrés dans la membrane interne mitochondriale. Des coenzymes mobiles sont également associés à la CRM dans la membrane interne. Il s'agit du coenzyme Q (CoQ, appelé aussi ubiquinol ou ubiquinone selon son état rédox) ayant une propriété lipophile et du cytochrome c (cyt c), qui est un coenzyme hémunique et hydrophile.

Les substrats des complexes I et II sont des coenzymes réduits nommés nicotinamide dinucléotide (NADH) et flavine adénine dinucléotide (FADH₂), présentant un faible potentiel d'oxydo-réduction. Le NADH et le FADH₂ proviennent de réactions oxydatives du métabolisme énergétique (glycolyse, béta-oxydation des acides gras, cycle de Krebs) (Figure 3).

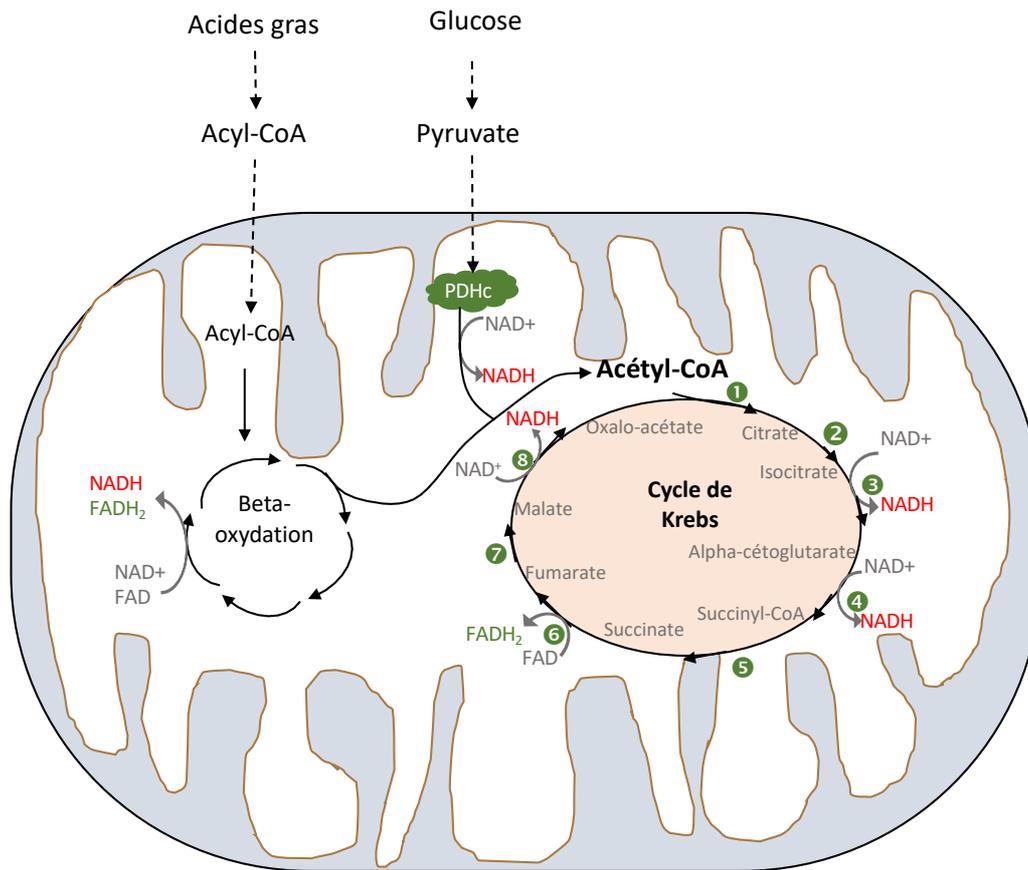


Figure 3: Origine des coenzymes réduits NADH et FADH₂ dans la mitochondrie à partir du catabolisme des acides gras et du glucose.

Les enzymes du cycle de Krebs sont : ❶ citrate synthase, ❷ : aconitase mitochondriale, ❸ : isocitrate déshydrogénase, ❹ : alpha-cétoglutarate déshydrogénase, ❺ : succinyl-coA synthétase, ❻ : succinate déshydrogénase (complexe II), ❼ : fumarate déshydrogénase, ❽ : malate déshydrogénase

Au cours de la glycolyse cytosolique, pour une molécule de glucose, deux molécules de NADH et deux molécules de pyruvate sont produites. Le NADH entre dans la mitochondrie par la navette malate-aspartate dans les tissus riches en mitochondries (cœur, foie, reins). Le pyruvate entre dans la mitochondrie via le transporteur mitochondrial du pyruvate (*mitochondrial pyruvate carrier MPC*). Il est métabolisé en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA) avec production de NADH par le complexe pyruvate déshydrogénase (PDHc). De son côté, la bêta-oxydation des acides gras produit une molécule de NADH, de FADH₂ et d'acétyl-CoA à chaque réduction de deux atomes de carbone d'un acide gras. (Figure 3). L'acétyl-CoA va entrer dans le cycle de Krebs. Pour chaque molécule d'acétyl-CoA qui est métabolisée, trois molécules de NADH et une molécule de FADH₂ sont produites au

niveau de quatre réactions enzymatiques du cycle de Krebs (isocitrate déshydrogénase ou IDH, alpha-cétoglutarate déshydrogénase ou KGDHc, succinate déshydrogénase, malate déshydrogénase).

Depuis les coenzymes réduits, les complexes I et II réalisent un transfert d'électrons jusqu'au complexe III, via le CoQ (Figure 4). Le complexe III capte les électrons depuis le CoQ et réduit le cyt C. Le complexe IV accepte ces électrons depuis le cyt C, qui participent avec les protons de la matrice à la réduction de l'oxygène en eau (Voet & Voet 1995). Le transfert d'électrons est couplé à un pompage de protons (H^+) de la matrice vers l'espace inter-membranaire au niveau des complexes I, III et IV. Ceci permet la conversion de la force électromotrice en force protomotrice. La force protomotrice permet ainsi la phosphorylation de l'ADP en ATP par le complexe V (ATP synthase) (Stryer et al. 2003).

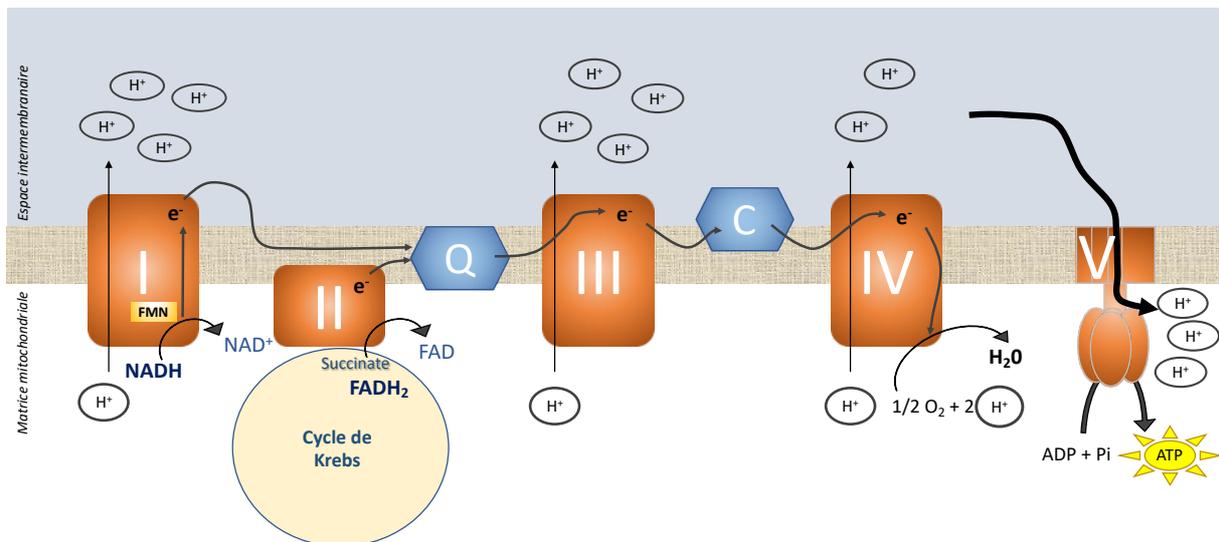


Figure 4 : Représentation schématique du transfert d'électrons associé au couplage de protons entre les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale.

La synthèse d'ATP est réalisée par le complexe V. Q : coenzyme Q, C : cytochrome C. I à V : complexes I à V de la CRM.

- **Le complexe I**

Le complexe I (NADH : ubiquinone déshydrogénase) est constitué de 45 sous-unités chez les mammifères dont quatorze sous-unités composant le « noyau » en forme de « L ». Parmi elles, 7 sous-unités hydrophiles forment un « bras » périphérique dans la matrice et 7 autres sous-unités hydrophobes (sous-unités ND)

et appartiennent à un domaine ancré dans la membrane interne (Figure 5). Les 31 autres sous-unités ont un rôle fondamental dans la structure, la stabilité et l'assemblage du complexe (Vinothkumar et al. 2014).

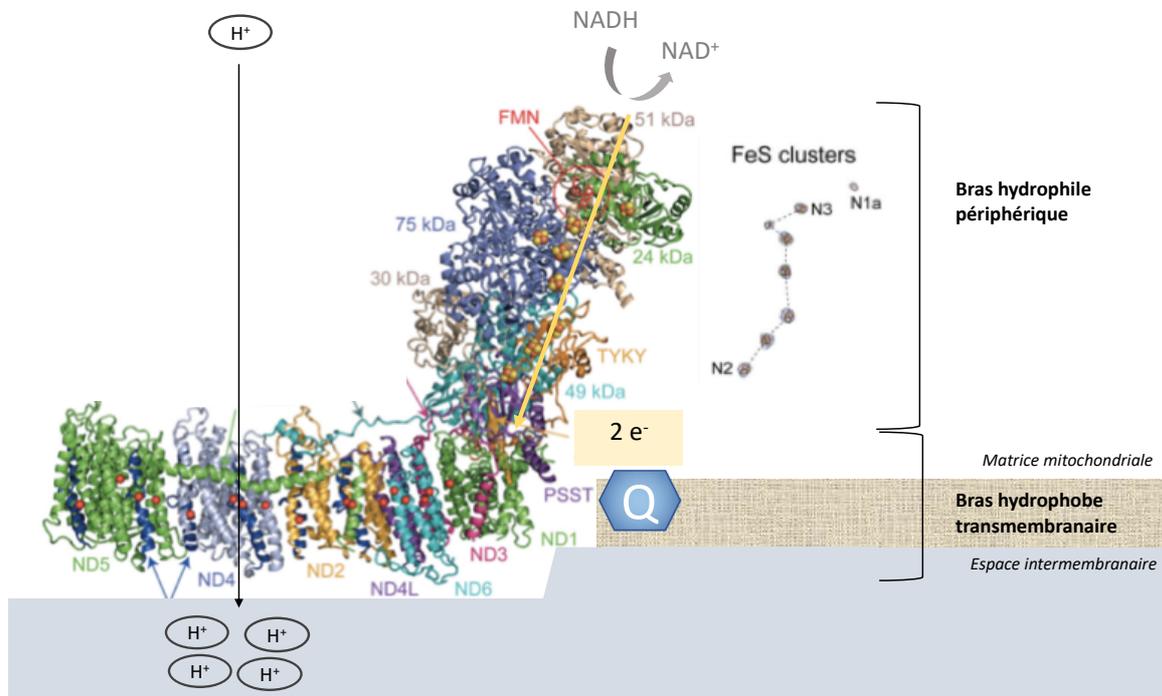


Figure 5 : Modèle structural du noyau du complexe I des mammifères formé de 14 sous-unités

Sept sous-unités constituent le bras hydrophobe (sous-unités ND) tandis que sept autres sous-unités forment le bras hydrophile, assurant la fonction catalytique. Adapté d'après (Vinothkumar et al. 2014; Zhu et al. 2016). Q : CoQ. Les sous-unités à centres Fe-S du bras hydrophile sont détaillées dans le Tableau 1.

Les sous-unités hydrophobes sont impliquées dans la translocation des H^+ à travers la membrane interne : quatre H^+ sont pompés de la matrice vers l'espace intermembranaire et initient le gradient de H^+ des OXPHOS. Le noyau hydrophile contient la FMN permettant l'oxydation du coenzyme NADH en NAD^+ . De plus, sept centres Fe-S (de type $[2Fe-2S]$ et $[4Fe-4S]$) (Tableau 1) sont essentiels au transfert d'électrons depuis le $FMNH_2$ jusqu'au CoQ et le rôle de chacun d'entre eux n'est pas encore complètement établi.

Sous-unité	Intitulé sur la Figure 5	Cofacteur (centre Fe-S)
NDUFV1	51 kDa	FMN, [2Fe-2S] (N1a)
NDUFV2	24 kDa	[4Fe-4S] (N3)
NDUFS1	75 kDa	[2Fe-2S], 2 [4Fe-4S] (N1b, N5, N7)
NDUFS3	30 kDa	
NDUFS8	TYKY	2 × [4Fe-4S] (N4)
NDUFS2	49 kDa	
NDUFS7	PSST	[4Fe-4S] (N2)

Tableau 1 : Cofacteurs des sous-unités hydrophiles du noyau du complexe I chez les mammifères.

D'après (Hirst 2013; Gnanndt et al. 2016)

A l'exception du centre N1A, les centres Fe-S sont essentiels à la formation d'un « tunnel » d'électrons intramoléculaire. Ce dernier débute depuis le FMNH₂ qui cède des électrons au centre N3 (Figure 5). Ensuite, les centres Fe-S de ce « tunnel » sont des relais pour le transfert d'électrons par leur capacité d'oxydo-réduction rapide et leur proximité. Le centre [4Fe-4S] N2 est le dernier centre Fe-S accepteur d'électrons avant leur transfert au CoQ. Le centre [2Fe-2S] N1a possède uniquement un rôle structural au sein du complexe et n'est pas impliqué dans le transfert d'électrons (Gnanndt et al. 2016).

L'assemblage du complexe I est un processus élaboré qui requiert 17 protéines d'assemblage dont la protéine NUBPL, la protéine NDUFAB1 (ACP) (Guerrero-Castillo et al. 2017; Sheftel et al. 2009; Stroud et al. 2016). NUBPL, anciennement appelée IND1, serait dédiée à l'insertion des centres Fe-S au sein des sous-unités réceptrices du complexe I.

- **Complexe II ou succinate-coenzyme Q déshydrogénase**

Le complexe II présente une activité enzymatique de succinate déshydrogénase dans le cycle de Krebs et une activité de transfert d'électrons dans la chaîne des OXPHOS. Il ne participe pas à la formation du gradient de protons transmembranaire, il est donc parfois considéré comme un complexe auxiliaire de la CRM (Lenaz & Genova 2010). Le complexe II est représenté sur la Figure 6.

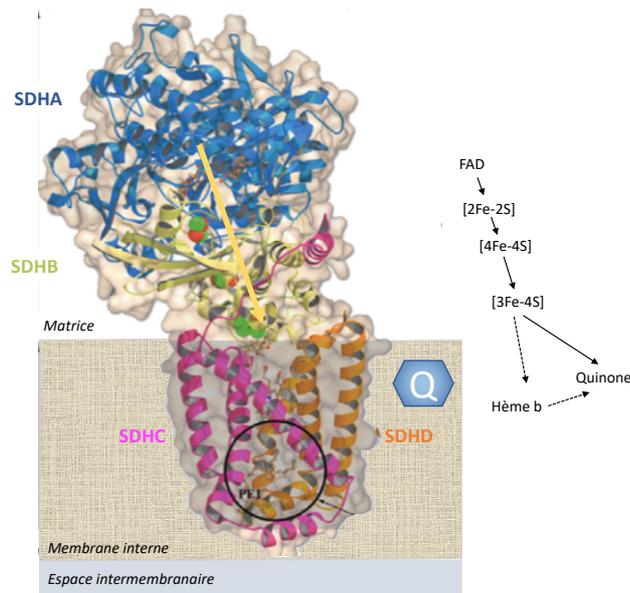


Figure 6 : Structure du complexe II chez les mammifères.

Schéma adapté de (Sun et al. 2005)

Le complexe II est composé de 4 sous-unités : SDHA, SDHB, SDHC et SDHD. Il est ancré dans la membrane interne mitochondriale par les deux sous-unités hydrophobes (SDHC et SDHD) qui renferment une molécule héminique de type b et un domaine de liaison au CoQ. Les deux autres sous-unités, SDHA et SDHB, forment le domaine soluble, tourné vers la matrice. SDHA porte l'activité catalytique d'oxydation du succinate et un site de liaison covalente du FADH₂. SDHB porte 3 centres Fe-S (un centre [2Fe-2S], un centre [3Fe-4S] et un centre [4Fe-4S]). Après liaison du FADH₂ sur SDHA, le complexe transfère deux électrons aux quinones (Cecchini 2003) (Figure 3). Les faibles distances entre le FADH₂ et les centres [2Fe-2S], [4Fe-4S] et [3Fe-4S] permettent un transfert rapide des électrons entre eux et jusqu'au CoQ qui est l'accepteur final des électrons. Le centre héminique de type b peut également servir d'accepteur intermédiaire d'électrons (Sun et al. 2005).

L'assemblage du complexe II chez l'homme requiert la protéine SDHAF1 (*SDH Assembly Factor type 1*), appartenant à la famille des protéines LYR. SDHAF1 est essentielle à l'insertion des centres Fe-S au sein de SDHB (Maio et al. 2016).

- **Le complexe III ou coenzymeQ-cytochrome c réductase**

Le complexe III est un complexe homodimérique d'environ 480 kDa avec 11 sous-unités chez les mammifères. Trois sous-unités forment le noyau catalytique appelé complexe bc1, impliqué dans le transfert d'électrons : les cytochromes b et c1 (cyt b et cyt c1) qui sont des protéines hémiques et la protéine Rieske (UQCRFS1) qui porte un centre [2Fe-2S] (Figure 7). Cyt b est une protéine hydrophobe transmembranaire tandis que cyt c1 et la protéine Rieske sont situés dans l'espace intermembranaire. Le complexe III catalyse le transfert d'électrons depuis le CoQ jusqu'au cyt c1. Le cyt c1 réduit devient alors le substrat du complexe IV de la CRM. Ce transfert est couplé à la translocation de deux protons à travers la membrane interne mitochondriale. L'enzyme possède deux sites de liaison du CoQ localisés sur des sites opposés de la membrane interne mitochondriale : un site d'oxydation (Qo) et un site de réduction (Qi) au niveau du cyt b.

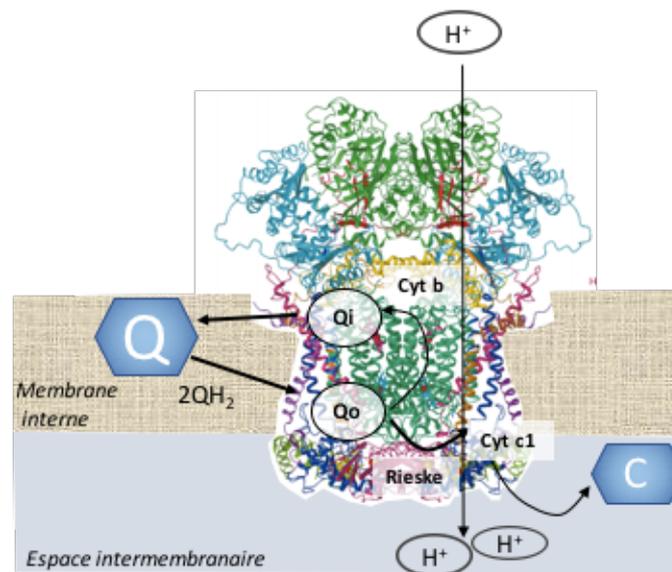


Figure 7 : Structure du complexe III chez les mammifères

Adapté d'après (Iwata et al. 1998; Lanciano et al. 2013). Q : CoQ, C : cyt C

L'assemblage du complexe III requiert deux étapes. Un pré-complexe de 10 sous-unités s'assemble sur la membrane interne. La protéine Rieske intègre ce pré-complexe. L'insertion du centre [2Fe-2S] au sein de la protéine Rieske grâce au facteur d'assemblage LYRM7 est requise pour cette étape (Fernandez-V et al. 2018).

- **Complexe IV ou cytochrome c oxydase (COX)**

Le complexe IV appartient à la superfamille des protéines hémiques à cuivre. La COX catalyse l'oxydation du cyt c réduit couplée à la réduction de O_2 en H_2O (Figure 8). Les 3 sous-unités formant le noyau sont codées par le génome mitochondrial. Il s'agit des sous-unités COX1, COX2 et COX3. Les 10 autres sous-unités sont codées par le génome nucléaire. La sous-unité COX1 contient les 2 centres hèmes à cuivre impliqués dans la réduction de O_2 . La sous-unité COX2 porte un atome de cuivre qui capte les électrons du cyt c. Les électrons sont ensuite transférés du cuivre jusqu'au groupement hémique de la sous-unité COX1 (Kadenbach & Hüttemann 2015). A chaque cycle catalytique complet, 2 molécules d'eau sont produites et 8 protons de la matrice mitochondriale sont nécessaires : 4 protons sont consommés lors de la réduction du dioxygène et 4 protons sont exportés vers l'espace intermembranaire (Taanman 1997; Lenaz & Genova 2010).

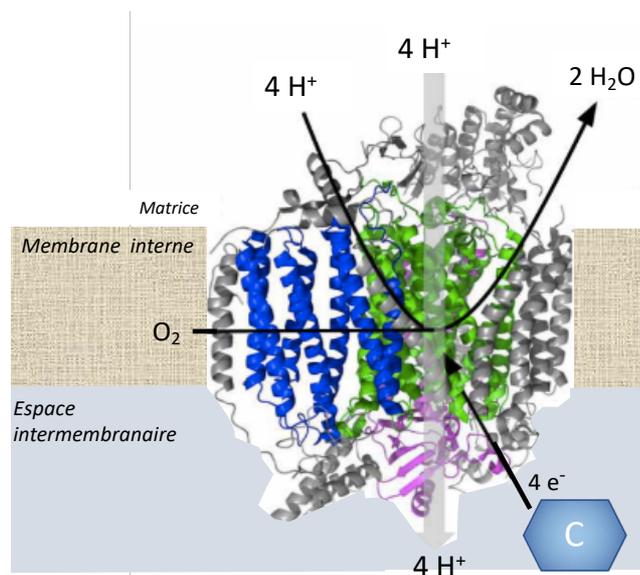


Figure 8 : Structure et fonction du complexe IV chez les mammifères.

Les sous-unités du noyau sont colorées en vert (COX1), en violet (COX2) et en bleu (COX3). Les autres sous-unités sont en gris. Le complexe IV est un dimère, mais pour plus de clarté un seul monomère du complexe IV est représenté. C : cyt C (adapté d'après (Rich 2017)).

- **Complexe V ou ATP synthase**

Selon le mécanisme proposé par Peter Mitchell en 1961, le transport d'électrons et la synthèse d'ATP sont couplés par un gradient de protons. Le transport de protons de part et d'autre de la membrane interne *via* les complexes I, III et IV génère un gradient de pH (ΔpH) et une différence de potentiel membranaire ($\Delta\psi$) à l'origine de la force protomotrice. La synthèse d'ATP survient lors du retour des protons dans la matrice au niveau de l'ATP synthase.

Ce complexe est composé de deux parties : une partie F_1 , située dans la matrice et un segment hydrophobe F_0 dans la membrane interne qui contient le canal à protons. La partie F_1 catalyse la phosphorylation/déphosphorylation de l'ATP. Elle est composée de cinq chaînes polypeptidiques dont la conformation est capitale pour la réaction enzymatique. L'entrée de protons dans le canal formé par la sous-unité F_0 stimule la rotation et l'activité catalytique de la sous-unité F_1 . Ainsi, la force protomotrice issue du transfert d'électrons par la CRM favorise le sens de synthèse d'ATP (Stryer et al. 2003).

Depuis les années 2000 et le développement d'études des complexes de la CRM en conditions natives par BN-PAGE (Blue Native-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) et SDS-PAGE en 2 dimensions, il est maintenant établi que les complexes interagissent et s'assemblent pour former des supercomplexes, de composition variable selon les espèces. Chez les mammifères, les supercomplexes peuvent être de type $I_1III_2IV_1$, $I_1III_2IV_2$ (Schägger & Pfeiffer 2001), $I_1III_2IV_4$ (Wittig et al. 2006) et $I_2III_2IV_2$ (R. Guo et al. 2017). Les complexes III et IV peuvent aussi s'associer selon le modèle III_2IV_4 (Wittig et al. 2006). Les complexes I et III peuvent également former un supercomplexe (Genova et al. 2008; Lenaz & Genova 2010; Gu et al. 2016). Le complexe II pourrait s'associer avec les complexes I, III et IV ou seulement avec le complexe III (Acín-Pérez et al. 2008). Le complexe V existerait sous forme de dimère au niveau des crêtes mitochondriales sans assemblage avec les autres complexes (Schägger & Pfeiffer 2001; Genova et al. 2008). Les rôles des supercomplexes seraient d'assurer l'assemblage et la stabilisation des complexes, et

de faciliter le transfert direct des électrons sans fuite afin de limiter la production d'espèces réactives de l'oxygène par le complexe I (Genova & Lenaz 2014).

1.2.2 *Rôle de la mitochondrie dans le métabolisme des ROS*

Les ROS sont impliqués dans les voies de signalisation intracellulaire de la survie cellulaire et aussi dans celles de la mitophagie et de l'apoptose. Les ROS sont aussi associés à des fonctions cellulaires vitales telles que la prolifération et la différenciation cellulaires, la réponse immunitaire et la sénescence cellulaire (Zorov et al. 2014). Le métabolisme des ROS repose sur un équilibre étroit entre leur production en quantité suffisante pour la fonctionnalité des voies de signalisation cellulaire, et leur élimination par les mécanismes antioxydants pour limiter leur impact toxique. Cet équilibre est appelé homéostasie rédox. Lorsque les ROS sont en excès ou en défaut, l'environnement rédox est instable et on parle respectivement de stress oxydatif ou de stress réducteur, tous deux délétères au fonctionnement cellulaire.

Les ROS sont produits dans la cellule sous forme de radicaux libres (anion superoxyde $O_2^{\cdot-}$, radical hydroxyl OH^{\cdot}) ou d'oxydants non radicaux (peroxyde d'hydrogène H_2O_2 et oxygène singulet 1O_2) (Zorov et al. 2014). Le superoxyde $O_2^{\cdot-}$ est le précurseur de la plupart des ROS et est hautement réactif (Belhadj Slimen et al. 2014). Il peut être dismuté en H_2O_2 spontanément ou par une superoxyde dismutase (SOD). Il peut aussi réagir avec d'autres radicaux comme NO conduisant à la formation de peroxynitrite $ONOO^{\cdot-}$ à fort pouvoir oxydant. L' H_2O_2 est peu réactif et peut diffuser à travers la membrane. Il participe à la production du radical OH^{\cdot} , beaucoup plus réactif que l' H_2O_2 , en réagissant avec l'ion Fe^{2+} selon la réaction de Fenton. Les protéines et les lipides de la cellule peuvent être oxydés par les ROS. Les protéines peuvent subir une modification réversible de leur résidu cystéine par oxydation du groupement thiol en groupement sulfinyl (SO_2H) et sulfonyl (SO_3H) par H_2O_2 (Rhee 2016). Les protéines sont aussi susceptibles d'être inactivées en protéines carbonylées ou clivées par réaction du radical OH^{\cdot} sur les acides aminés qui les constituent. Les acides gras insaturés peuvent eux aussi être oxydés par le

radical OH^\cdot ce qui aboutit à la formation de produits de peroxydation lipidique, qui peuvent également participer à la carbonylation des protéines (Fedorova et al. 2014). Les produits d'oxydation des protéines et des lipides par le radical OH^\cdot sont irréversibles et la peroxydation lipidique membranaire peut même engendrer la rupture des membranes d'un organelle ou de la cellule. L'ADN peut être oxydé par les radicaux libres au niveau des bases et des désoxyriboses ce qui entraîne des adduits à l'ADN ou la transformation de guanosine en 8-oxo-guanosine (Dizdaroglu & Jaruga 2012).

In cellulo, la production de ROS semble difficile à évaluer (Murphy 2009). Une équipe a montré qu'en conditions physiologiques sur mitochondries isolées, l'émission de ROS constitue environ 2% de l'oxygène consommé dans la mitochondrie (Chance et al. 1979). La mitochondrie participe à l'équilibre entre la production et l'élimination des ROS. La cellule a mis en place des systèmes de régulation pour maintenir une production de ROS adaptée à la signalisation rédox et limiter le stress oxydatif.

1.2.2.1 Les sites de production mitochondriale de ROS

Les complexes de la CRM et les flavoenzymes telles que la sous-unité E3 de KGDHc sont les principaux sites de production de $\text{O}_2^{\cdot-}$. Les complexes I et III de la CRM sont des sources de ROS dont la production est dépendante de la force protomotrice, de l'état rédox NADH/NAD⁺ et de la quantité de CoQ réduit (CoQH₂). Le complexe IV participe aussi à la production mitochondriale de ROS par un mécanisme différent (Figure 9).

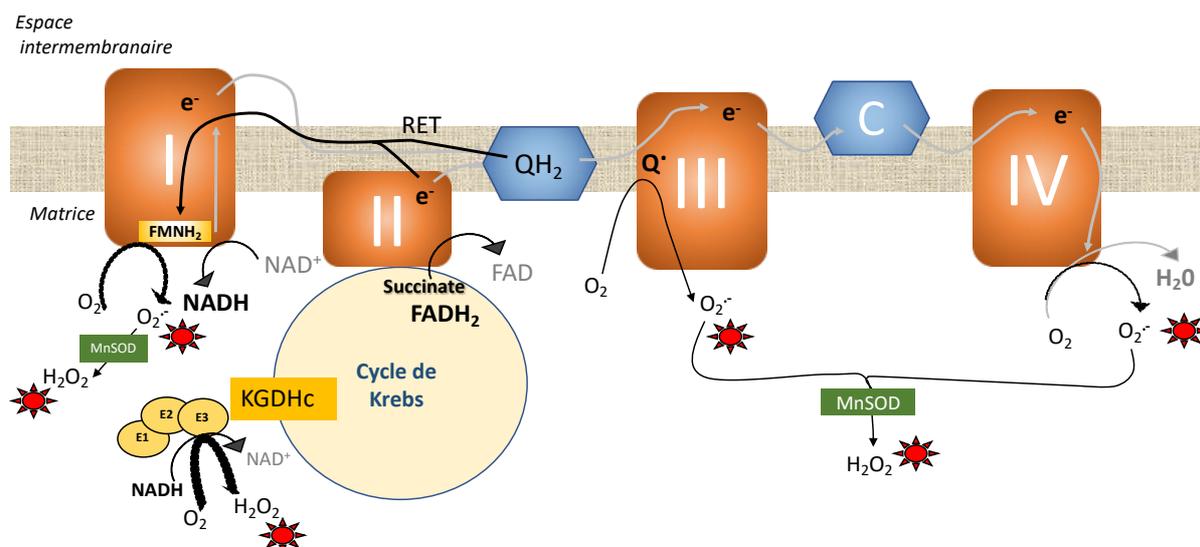


Figure 9 : Représentation schématique des principaux sites de production des ROS par les complexes I, III et IV de la CRM et par la sous-unité E3 du complexe KGDHc.
 Les ROS produits sont signalés par une étoile rouge (H_2O_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$). MnSOD : superoxyde dismutase à manganèse ; RET : reverse electron transfert ; QH_2 : CoQ réduit ; C : cyt C.

Au niveau du complexe I, il existerait deux mécanismes principaux de production de ROS : (i) le site de la flavine à l'état réduit, FMNH_2 , peut réagir directement avec l' O_2 pour former de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$, notamment lorsque le ratio NADH/NAD^+ s'élève, c'est-à-dire dès lors que la CRM est moins efficace (Liu et al. 2002; Murphy 2009), (ii) un transfert d'électrons inverse (*reverse electron transfert* RET) peut avoir lieu depuis le CoQH_2 jusqu'au FMN, et entraîne la réduction du NAD^+ en NADH . Le site de production de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ pourrait être un ou plusieurs site(s) de liaison du CoQ du complexe I. Le RET survient lorsque la force protomotrice et la concentration de CoQH_2 sont élevés, notamment en présence de succinate (substrat du complexe II) (Murphy 2009; Kowaltowski et al. 2009). Le complexe II ne produit pas ou peu de ROS directement (Yankovskaya et al. 2003).

Au niveau des sites de liaison du complexe III au CoQH_2 , $\text{O}_2^{\cdot-}$ peut également être formé. Un intermédiaire réactionnel physiologique de la réaction d'oxydation du CoQH_2 par le complexe III est le radical semiquinone (Q^{\cdot}), qui peut réagir avec l' O_2 pour produire de l' $\text{O}_2^{\cdot-}$ (Kowaltowski et al. 2009).

La réduction de l'O₂ en H₂O par le complexe IV de la CRM nécessite quatre électrons. Lors de cette réaction, une faible quantité d'O₂^{·-} est produite par réduction incomplète monoélectronique de l'O₂. L'O₂^{·-} est ensuite détoxifié par les superoxyde dismutases (SOD) en H₂O₂, une espèce réactive de l'oxygène plus stable (Kowaltowski et al. 2009).

L'autre principal site de production des ROS dans la mitochondrie est le complexe KGDHc du cycle de Krebs. En effet, la sous-unité E3 de KGDHc est un site de production d'H₂O₂. Cette production est majorée lorsque le ratio NADH/NAD⁺ mitochondrial augmente, c'est-à-dire lorsque la CRM est moins efficace (Adam-Vizi 2005).

Il existe d'autres sources mitochondriales de ROS comme la monoamine oxydase, la protéine p66^{shc} et la NADPH-oxydase qui ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

1.2.2.2 Mécanismes antioxydants de la mitochondrie

La mitochondrie possède plusieurs systèmes de détoxification des ROS afin de maintenir une homéostasie rédox c'est-à-dire une quantité de ROS suffisante à la signalisation cellulaire et limitée pour éviter le stress oxydatif. Parmi les systèmes antioxydants disponibles (Figure 10), il y a les antioxydants directs, des voies enzymatiques et des voies de régulation de la production de ROS au niveau des complexes de la CRM.

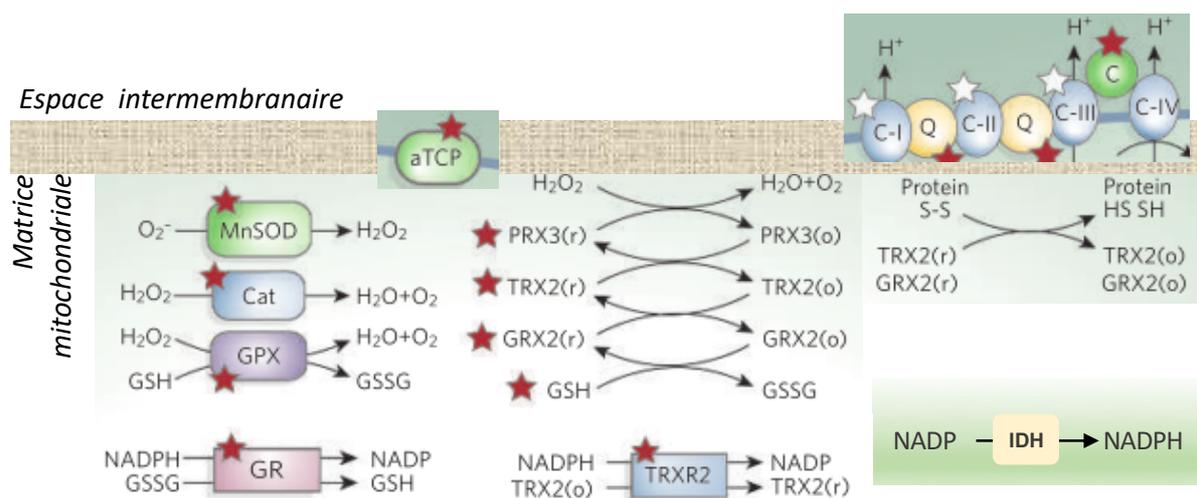


Figure 10 : Principales voies de détoxification des ROS dans la mitochondrie.

Les acteurs de ces voies sont identifiés par une étoile rouge. Les composants antioxydants matriciels et les enzymes de régénération des substrats incluent Cat : catalase, GPX : glutathion peroxydase, GR : glutathion réductase, GRX2 glutarédoxine 2, GSH : glutathion réduit, GSSG : glutathion oxydé, IDH : isocitrate déshydrogénase, MnSOD : superoxyde dismutase à manganèse, PRX3 : peroxyrédoxine, TRX2 : thiorédoxine 2, TRXR2 : thiorédoxine réductase. Les autres composants antioxydants membranaires incluent l'alpha-tocophérol (alpha-TCP), le coenzyme Q (Q) et le cytochrome c (C). (o) : forme oxydée, (r) : forme réduite. Adapté d'après (Lin & Beal 2006).

Parmi les composés non-enzymatiques, l'alpha-tocophérol (vitamine E) et le cyt C interviennent dans l'élimination de $O_2^{\cdot -}$ (Venditti et al. 2013). L'acide lipoiq̃ue est également décrit comme un antioxydant direct qui peut éliminer le radical OH^{\cdot} et l^1O_2 (Rochette et al. 2013).

Plusieurs enzymes interviennent dans la détoxification des ROS. Tout d'abord, les SOD réduisent $l'O_2^{\cdot -}$ en H_2O_2 . Une SOD dépendante du manganèse (Mn-SOD) est située dans la matrice mitochondriale et une autre dépendante du cuivre et du zinc (Cu-Zn-SOD) est présente principalement dans le cytosol mais aussi dans l'espace intermembranaire. De plus, une cascade de réactions rédox partant du glutathion réduit (GSH) puis faisant intervenir successivement la glutarédoxine 2 (GRX2), la thiorédoxine (TRX) et les peroxyrédoxines (PRX) permet l'élimination d' H_2O_2 par cette dernière (Lin & Beal 2006). H_2O_2 est aussi réduite en H_2O par la catalase et la glutathion peroxydase (GPX). Cette dernière utilise l'oxydation du GSH en glutathion oxydé (GSSG) pour réduire H_2O_2 en H_2O . Le glutathion oxydé est ensuite régénéré par la glutathion réductase (GR), enzyme NADPH dépendante. Il

en est de même pour la thiorédoxine réductase, qui permet la régénération de la thiorédoxine réduite. Le NADPH est, quant à lui, produit par l'isocitrate déshydrogénase, une enzyme du cycle de Krebs. La régénération des formes oxydées du GSH et de la thiorédoxine en forme réduite est donc dépendante de la fonctionnalité du cycle de Krebs pour fournir en quantité suffisante le NADPH. Pour finir, les thiorédoxines interviennent dans la réduction de ponts disulfures protéiques, en collaboration avec les PRX (Venditti et al. 2013).

Le principal mécanisme utilisé par la CRM pour contrôler la production mitochondriale de ROS est l'accélération du transfert d'électrons pour diminuer le ratio NADH/NAD⁺ et donc la production d'O₂^{•-} (Kowaltowski et al. 2009). Lorsque le flux d'électrons et la consommation d'O₂ s'accélèrent, il y a une baisse de son potentiel rédox et une diminution de la formation d'O₂^{•-}. Le transfert d'électrons peut être accéléré par élévation de la concentration calcique mitochondriale et par découplage de la phosphorylation oxydative. Les protéines découplantes sont stimulées par les ROS, et dans ces conditions, l'ATPase n'est plus couplée aux autres complexes de la CRM et cela diminue la force protomotrice. La synthèse d'ADP augmente alors dans l'espace intermembranaire puis l'ADP traverse la membrane interne via un transporteur couplé à des acides gras. Ces acides gras permettent la translocation des protons de l'espace intermembranaire vers la matrice. Les protons peuvent également emprunter d'autres transporteurs (ATP ou K⁺ dépendants) (Kowaltowski et al. 2009).

La morphologie mitochondriale et le contenu cellulaire en mitochondries ont aussi un rôle dans la prévention du stress oxydatif en participant à l'équilibre de la production des ROS selon les besoins de la cellule. Il a été montré que la fission mitochondriale a un rôle dans l'augmentation de la production de ROS et que l'inhibition de la fission diminue la formation de ROS (Yu et al. 2008).

1.2.3 Synthèse de l'hème

En plus de son rôle dans le métabolisme énergétique et l'homéostasie rédox, la mitochondrie est également le site de la synthèse de groupements prosthétiques tels

que les centres fer-soufre voir (paragraphe 2.2, p.35) et l'hème, cofacteurs essentiels à de nombreuses protéines.

L'hème est une métalloporphyrine constituée d'un atome de fer ferreux (Fe^{2+}) coordonné par quatre molécules d'azote issus d'un anneau tétrapyrrole. Selon la nature des groupements sur les chaînes latérales du tétrapyrrole, on distingue plusieurs types d'hèmes. Chez les mammifères, l'hème *a* est présent au sein du complexe IV de la CRM, l'hème *b* au sein des cytochromes b, et l'hème *c* dans les cytochromes c. La synthèse de l'hème requiert 8 réactions enzymatiques dont 4 sont mitochondriales. Elle débute par la synthèse de l'acide delta-amino-lévulinique (ALA) dans la mitochondrie, par l'ALA synthase, à partir de succinyl-CoA et de glycine. L'ALA est exporté dans le cytosol puis, par 4 condensations enzymatiques successives de plusieurs molécules d'ALA, le coproporphyrinogène est produit. Il va entrer dans la mitochondrie via le transporteur PBR (*peripheral-type benzodiazepine receptor*) puis être métabolisé au niveau de la membrane interne mitochondriale en protoporphyrinogène puis protoporphyrine. La dernière étape, avant la modification des chaînes latérales de l'anneau tétrapyrrole, consiste en l'insertion de l'atome de fer au sein de la protoporphyrine. Cette réaction est catalysée par une protéine Fe-S, la ferrochélatase. La ferrochélatase est un homodimère et chaque monomère contient un centre $[2\text{Fe}-2\text{S}]$, dont la fonction reste inconnue à ce jour (Barupala et al. 2016).

La biogenèse des centres Fe-S requiert 18 protéines de la machinerie d'assemblage des centres Fe-S dans la matrice mitochondriale. Elle est détaillée dans le chapitre suivant.

2 Les protéines à centres Fer-Soufre

2.1 Structure et fonctions des centres Fer-Soufre

2.1.1 *Structure*

Les centres fer-soufre (Fe-S) sont des groupements prosthétiques associant des atomes de soufre et de fer inorganique. Ils sont présents chez presque tous les organismes vivants, même les plus primitifs (archae, bactéries, règnes végétal et animal) et probablement avant l'apparition de la vie sur terre (Imlay 2006). Différents types de centres Fe-S existent et chez les mammifères, on retrouve principalement les centres [2Fe-2S], [3Fe-4S] et [4Fe-4S]. Leur géométrie varie selon leur nucléarité : ils peuvent être de structure rhombique ([2Fe-2S]) ou cubique ([3Fe-4S] et [4Fe-4S]) (Figure 11). Les centres Fe-S sont reliés par liaison non covalente entre le fer et un atome de soufre, d'azote ou plus rarement d'oxygène, situé sur la chaîne latérale de certains acides aminés des protéines qui les portent. Cette liaison est établie avec un atome de soufre d'une cystéine le plus souvent, et moins fréquemment avec un atome d'azote de l'histidine ou l'arginine, ou un atome d'oxygène de la sérine, de l'aspartate et de la glutamine (Johnson et al. 2005).

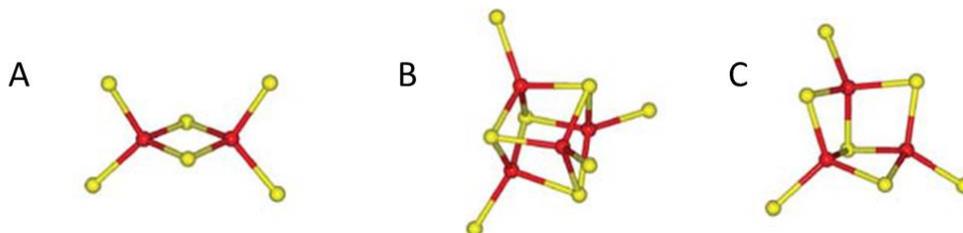


Figure 11: Structures des centres fer-soufre.

(A) : structure rhombique pour le centre [2Fe-2S], (B) et (C) : structure cubique pour les centres [4Fe-4S] (B) et [3Fe-4S] (C) (Johnson et al. 2005)

2.1.2 Fonctions des centres fer-soufre

2.1.2.1 Rôle dans le transfert d'électrons

Le premier rôle identifié des centres Fe-S est celui du transfert d'électrons. En effet, les atomes de fer peuvent passer d'un état réduit (ion ferreux Fe^{2+}) à l'état oxydé (ion ferrique Fe^{3+}) et vice-versa. Cette capacité d'oxydo-réduction permet ainsi le transport et l'échange d'électrons. Cette fonction de donneur ou d'accepteur d'électron est mise à profit, notamment, dans les protéines Fe-S des complexes I, II et III de la CRM (paragraphe 1.2.1, p.15).

2.1.2.2 Rôle dans la catalyse enzymatique

Certains centres Fe-S participent à la catalyse enzymatique. C'est le cas de l'aconitase, enzyme mitochondriale du cycle de Krebs ou enzyme cytosolique, qui renferme un centre $[4Fe-4S]$ dont trois atomes de fer sont reliés à trois cystéines du site actif. Le dernier atome de fer n'est pas relié à un résidu de la chaîne polypeptidique et joue le rôle d'un acide de Lewis. Il interagit directement avec le substrat (le citrate) et les molécules d'eau pour initier une déshydratation puis une hydratation et former l'isocitrate (Lauble et al. 1992). Le centre $[4Fe-4S]$ est donc indispensable à l'activité enzymatique de l'aconitase.

Les centres Fe-S ont un rôle d'oxydo-réduction au sein d'enzymes à radical S- adénosyl-méthionine (SAM) qui portent un ou plusieurs centre(s) $[4Fe-4S]$. Trois des quatre atomes de fer sont liés à des résidus cystéines de l'enzyme tandis que le dernier est lié au SAM (Figure 12). Lors de la catalyse, le centre Fe-S capte l'électron produit ce qui conduit à la formation du radical 5'-désoxyadénosyl \cdot ($5'-dA\cdot$) et de méthionine (Landgraf et al. 2016).

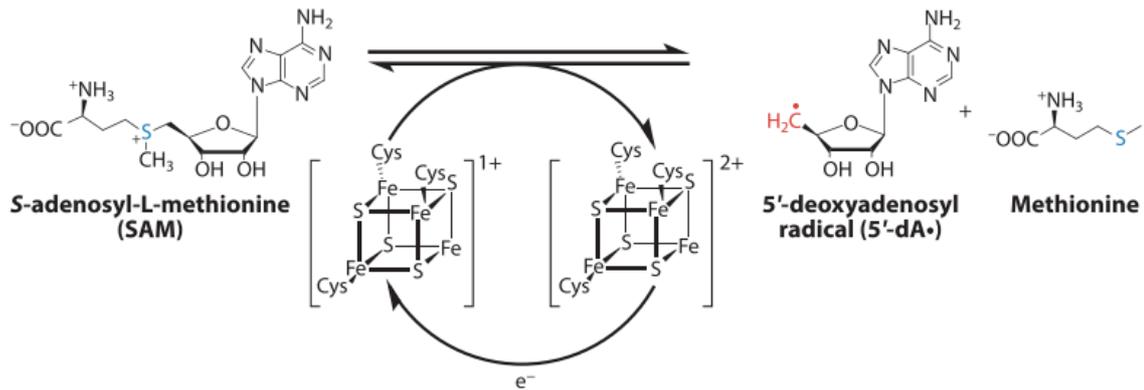


Figure 12: Activité catalytique des enzymes à radical SAM.

Le radical SAM est clivé en méthionine et radical 5'désoxyadénosyl (5'-dA•) et le centre [4Fe-4S] est réduit (Landgraf et al. 2016).

La lipoic acid synthase (LIAS) est une enzyme à radical SAM qui possède deux centres [4Fe-4S]. Elle intervient dans la synthèse de l'acide lipoïque qui sera détaillée dans la troisième partie de cette introduction.

2.1.2.3 Rôle dans le métabolisme de l'ADN

Parmi les protéines Fe-S nucléaires, on peut citer l'ADN primase, une ARN polymérase participant à la réplication de l'ADN (Weiner et al. 2007) et les hélicases (XPD et FancJ) qui jouent un rôle essentiel dans la transcription ou la réparation de l'ADN. L'hydrolyse enzymatique de l'ATP en ADP par l'hélicase entraînerait la modification de l'état d'oxydation de son centre Fe-S et une modification conformationnelle de la protéine, conduisant au déplacement de l'enzyme sur le brin d'ADN. En l'absence de centre Fe-S, l'hélicase ne peut plus se déplacer sur le brin d'ADN (Rudolf et al. 2006).

Les ADN glycosylases de type Base Excision Repair (BER ; MutY ou EndoIII, chez *Escherichia coli* ou les homologues MUTYH et hNTH1 chez l'homme) possèdent également un centre [4Fe-4S]. Ce dernier aurait un rôle de détection des lésions à l'ADN (mésappariement, lésion oxydative...). En effet, une double hélice d'ADN parfaite a la capacité de transférer les électrons entre le centre Fe-S d'une

ADN glycosylase de type BER à une autre. Cette capacité est perdue en présence d'une anomalie sur une base, car le transfert d'électrons s'arrête. Les glycosylases utiliseraient donc ce transfert de charge de l'ADN pour scanner l'ADN afin de localiser et réparer efficacement ses défauts (Fuss et al. 2015; Golinelli-Cohen & Bouton 2017).

2.1.2.4 Rôle dans la régulation des gènes

L'IRP1 (Iron Regulatory Protein 1) est une protéine bi-fonctionnelle dont les activités s'excluent mutuellement par la présence ou l'absence d'un centre Fe-S. En conditions physiologiques, l'IRP1 est une aconitase à centre [4Fe-4S] (holo-protéine) localisée dans le cytosol des cellules, convertissant le citrate en isocitrate. En cas de carence en fer dans la cellule, l'IRP1 n'assemble plus son centre Fe-S (apo-protéine) et devient un régulateur de la traduction en se liant spécifiquement à des motifs d'ARN appelées *iron responsive element* (IRE). L'interaction apo-IRP1/IRE dans la région 3' de l'ARNm du récepteur de la transferrine stabilise l'ARNm, facilitant la traduction de la transferrine donc l'import de fer dans la cellule est ainsi augmenté. L'apo-IRP1 interagit également avec des IRE situés en 5' de l'ARNm des deux sous-unités de la ferritine inhibant leur traduction. Le stockage du fer dans la cellule sous forme de ferritine est donc limité. Lorsque le stock de fer intracellulaire est à nouveau biodisponible, l'apo-protéine IRP1 est convertie en aconitase à centre [4Fe-4S], et perd sa capacité à se lier aux séquences IREs. La traduction de la ferritine est alors déréprimée, permettant le stockage du fer non utilisé par la cellule et l'ARNm de la transferrine n'est plus stabilisé (Ye & Rouault 2010; Crack & Le Brun 2017). L'IRP1 est essentielle à la régulation du fer intracellulaire et participe indirectement à la biogenèse des centres Fe-S en régulant la source de fer cellulaire (Galy et al. 2010).

2.1.2.5 Rôle dans la réparation des autres protéines Fe-S

La protéine mitoNEET est une protéine à centre [2Fe-2S] ancrée sur la membrane externe mitochondriale. MitoNEET est impliquée dans la réparation du

centre Fe-S de l'aconitase cytosolique en réponse à un stress oxydatif, par une réaction de transfert de son centre Fe-S (Ferecatu et al. 2014).

2.2 Biogenèse mitochondriale des protéines à centre Fe-S

Les études pionnières sur la biogenèse des centres Fe-S ont été réalisées chez la bactérie (Zheng et al. 1993) et ensuite, des protéines homologues ont été mises en évidence chez la levure et l'homme (Land & Rouault 1998; Kispal et al. 1999). Alors que la reconstitution chimique *in vitro* des centres Fe-S peut se faire de manière spontanée en présence de protéines réceptrices, elle requiert *in vivo* une ou plusieurs machineries protéiques complexes afin d'éviter un effet toxique du fer et du soufre inorganique libres sur les protéines cellulaires. Ces machineries comprennent différentes étapes-clés pour synthétiser les centres Fe-S et les insérer au sein de leurs apo-protéines cibles (mitochondriales, cytosoliques ou nucléaires).

La biogenèse des centres Fe-S débute dans la mitochondrie grâce à une machinerie complexe de 18 protéines qui permet la synthèse de centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S] destinés, en premier lieu, aux protéines Fe-S mitochondriales (Figure 13). D'autre part, grâce à un système d'export mitochondrial de type ABC (ABCB7), un centre [2Fe-2S] coordonné à 4 molécules de GSH (Li & Cowan 2015) ou un autre composé soufré complexé au GSH (Srinivasan et al. 2014) pourrait être exporté vers le cytosol puis utilisé par la machinerie Fe-S cytosolique (CIA, constituée de 11 protéines) dédiée à la maturation des protéines extra-mitochondriales à centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S].

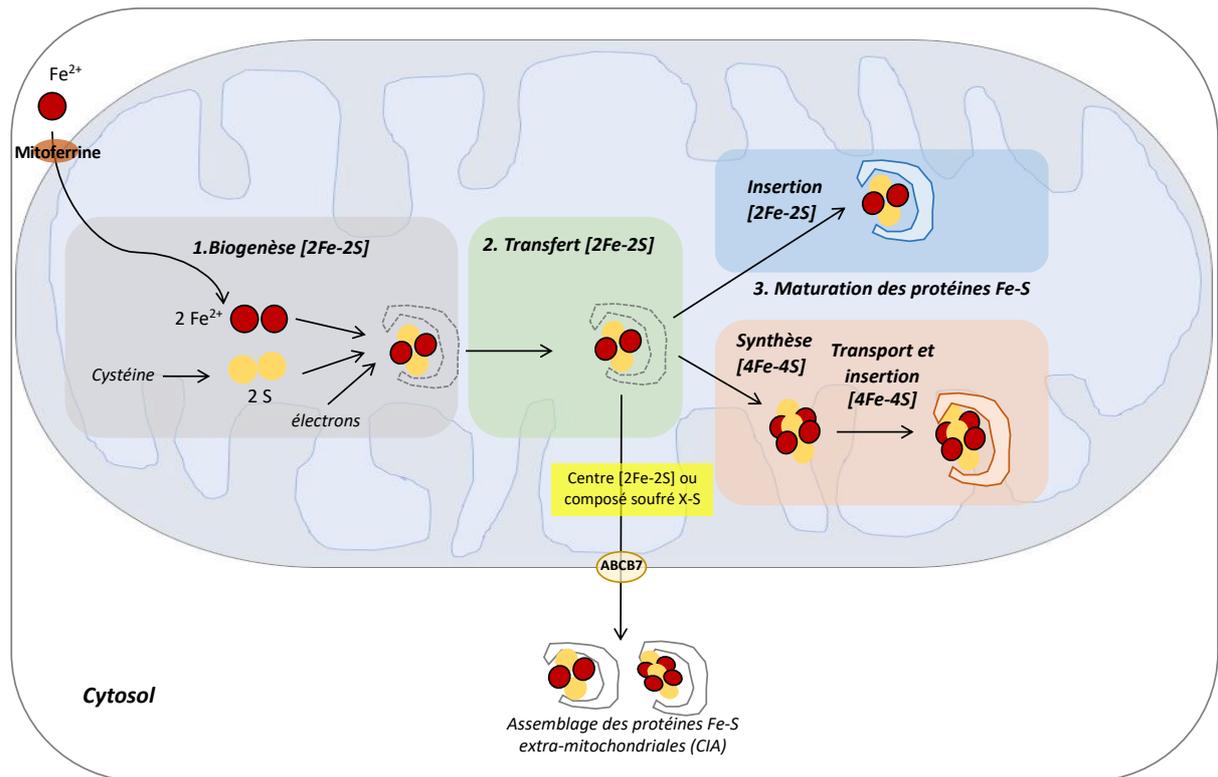


Figure 13 : Schéma général de la biogenèse des centres Fe-S chez les eucaryotes.

Les rectangles de couleur représentent les différentes étapes de la biogenèse des centres Fe-S: synthèse *de novo* du centre [2Fe-2S] sur la protéine ISCU (gris foncé), transfert du centre [2Fe-2S] de ISCU vers GLRX5 (vert clair), et maturation des protéines [2Fe-2S] (bleu) et des protéines [4Fe-4S] (orange). Le centre [2Fe-2S] ou un composé soufré de structure inconnue serait exporté vers le cytosol par le transporteur ABCB7. Adapté d'après (Braymer & Lill 2017)

2.2.1 Première étape : synthèse *de novo* d'un centre [2Fe-2S] sur la protéine échafaud ISCU

La première étape de la synthèse de tous les centres Fe-S de la cellule est mitochondriale : il s'agit de la constitution d'un centre [2Fe-2S] sur une protéine échafaud appelée ISCU (*iron-sulfur cluster assembly enzyme*) (Figure 14) à partir de fer cytosolique et de soufre inorganique provenant de la désulfuration de la L-cystéine dans la mitochondrie.

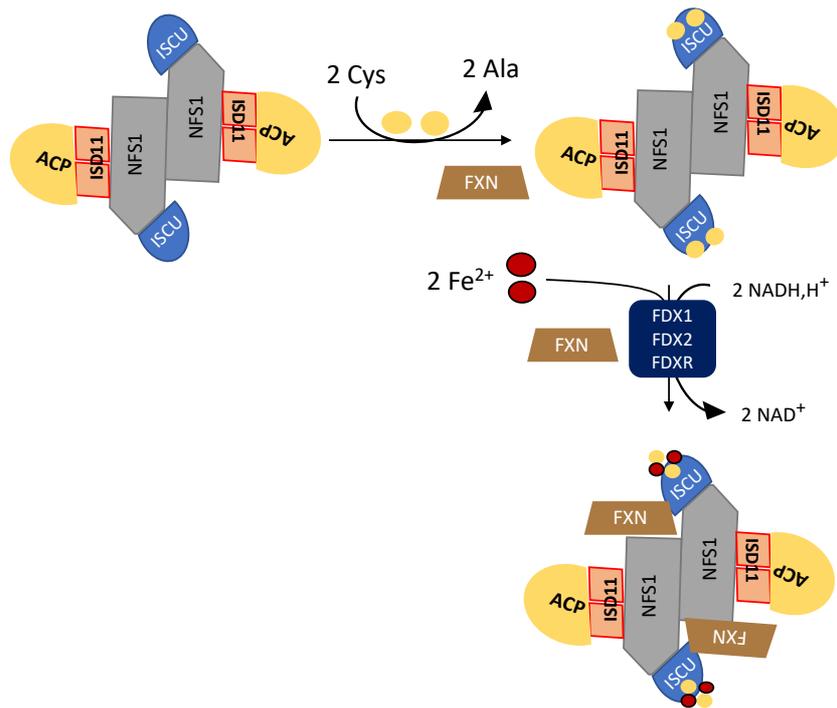


Figure 14 : Synthèse *de novo* du centre [2Fe-2S] sur la protéine échafaud ISCU.

Ronds jaunes : soufres inorganiques ; Ronds rouges : ions Fe^{2+} . ACP : acyl-carrier protein, FXN : frataxine, FDX : ferrédoxine, FDXR : ferrédoxine réductase. Adapté d'après (Maio & Rouault 2015).

Le fer est tout d'abord importé dans la mitochondrie par la mitoferrine 2 (Paradkar et al. 2009). Le soufre provient de la désulfuration de la L-cystéine par la cystéine désulfurase NFS1 complexée aux protéines ISD11 et ACP (Adam et al. 2006; Wiedemann et al. 2006; Boniecki et al. 2017). Le positionnement de la frataxine dans cette étape de la machinerie n'est pas encore complètement élucidé. Pour certains, elle permettrait d'accélérer le transfert du soufre depuis NFS1 vers ISCU (Parent et al. 2015) tandis que, pour d'autres, elle stabiliserait le complexe protéique et régulerait l'apport du fer (Colin et al. 2013; Cai et al. 2018). De plus, la génération d'un centre [2Fe-2S] à partir de Fe^{2+} et de soufre nécessite un apport d'électrons. En présence de NADH, la ferrédoxine FDX2 et la ferrédoxine réductase (FDXR) permettraient la réduction du groupement persulfure en sulfure capable de se lier au fer afin de constituer le centre [2Fe-2S] sur ISCU (holo-ISCU) (Lill et al. 2006; Sheftel et al. 2010). La fonction de la protéine FDX1 est controversée. Pour certains, elle pourrait avoir le même rôle que FDX2 (Shi et al. 2012; Cai et al. 2017) et

participer au transfert d'électrons alors que pour d'autres, seule FDX2 possède cette propriété (Sheftel et al. 2010).

2.2.2 Deuxième étape : transfert du centre [2Fe-2S]

Cette étape comprend : i) la libération du centre [2Fe-2S] de holo-ISCU par un système chaperon dédié ii) le transfert du centre [2Fe-2S] à GLRX5 ou aux protéines de la famille LYR.

2.2.2.1 Libération du centre [2Fe-2S] de holo-ISCU

La libération du centre [2Fe-2S] de holo-ISCU nécessite le recrutement de protéines chaperones de type HSP70 nommées HSC20 et HSPA9 (mortaline) chez l'homme (Figure 15). HSC20 se lie à la protéine holo-ISCU, entraînant la dissociation du complexe [holo-ISCU]-NFS1-ISD11-ACP, et, HSC20 interagit également avec la chaperone HSPA9 pour former un complexe [holo-ISCU]-HSC20-HSPA9. HSC20 stimule alors l'activité ATPasique de HSPA9 et l'énergie fournie par l'ATP induit des changements conformationnels de l'ensemble du complexe [holo-ISCU]-HSC20-HSPA9 qui permettent la libération du centre [2Fe-2S] de ISCU. Le centre [2Fe-2S] est ensuite pris en charge par des protéines de transport (GLRX5 ou protéines de la famille LYR) jusqu'aux apo-protéines réceptrices mitochondriales (Rouault 2012; Lill et al. 2012; Wachnowsky et al. 2018).

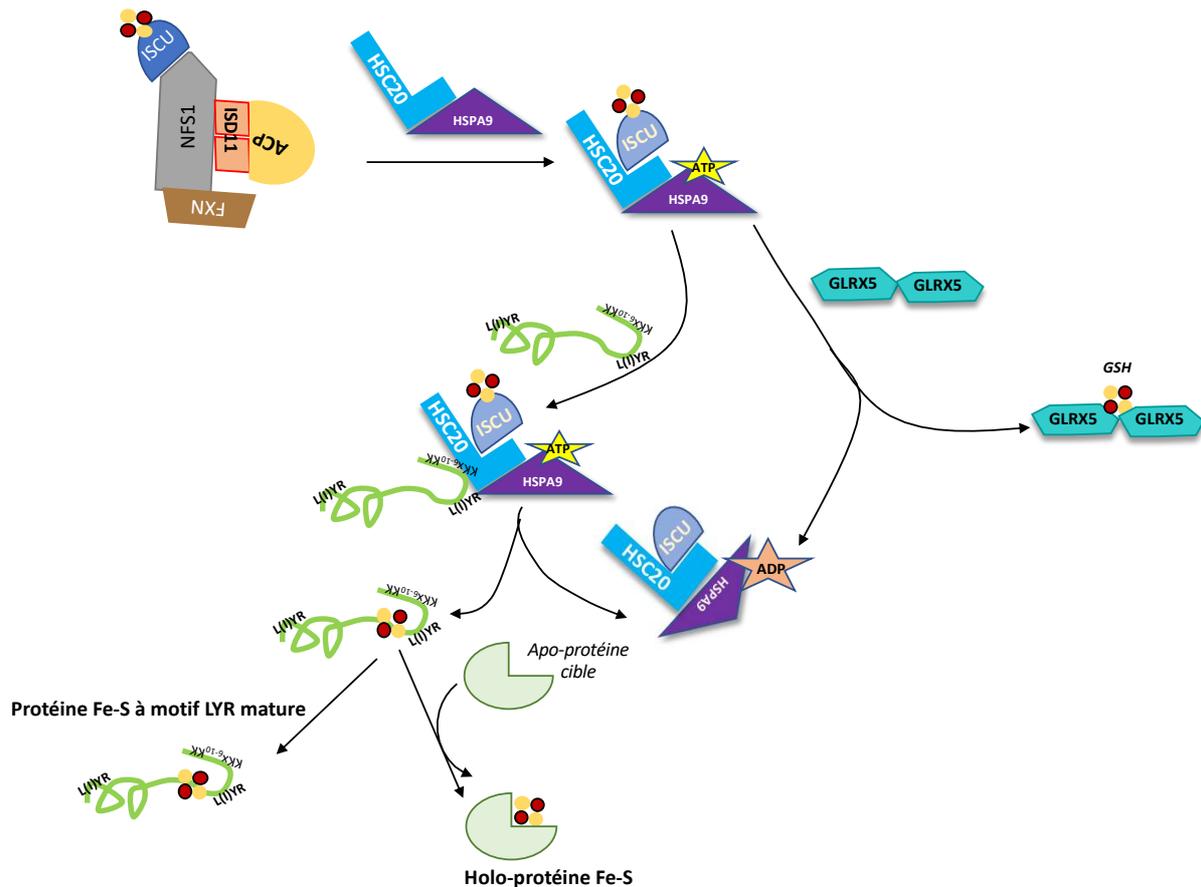


Figure 15 : Transfert du centre [2Fe-2S] depuis holo-ISCU à GLRX5 ou à une protéine LYR.

Le complexe formé par holo-ISCU et les chaperones HSPA9 et HSC20 peut interagir avec la protéine GLRX5 ou une protéine porteuse d'un motif LYR, et leur transférer le centre [2Fe-2S] par la réaction ATPasique de HSPA9. Adapté de (Lane et al. 2014).

2.2.2.2 Transfert du centre [2Fe-2S] de holo-ISCU sur GLRX5 ou sur les protéines LYR

La première voie intègre GLRX5 comme protéine réceptrice du centre [2Fe-2S] issu du complexe [holo-ISCU]-HSC20-HSPA9. GLRX5, sous forme dimérique, est capable de lier le centre [2Fe-2S] et de le transférer aux apo-protéines cibles (Figure 15) (Beilschmidt & Puccio 2014; Paul & Lill 2014; Wachnowsky et al. 2018). Dans un premier temps, GLRX5 interagit avec HSC20 (Maio et al. 2014) et ISCU (Liu et al. 2016). Après formation du complexe [holo-ISCU]-HSC20-HSPA9-GLRX5, le centre [2Fe-2S] est transféré sur la protéine GLRX5 (Uzarska et al. 2013). Le centre [2Fe-2S] est coordonné à deux résidus cystéine de GLRX5 (résidu Cys₆₇ de chaque

monomère) et au résidu cystéine de deux molécules de glutathion (Banci et al. 2014; Couturier et al. 2015). Cette coordination atypique confère une certaine labilité au centre [2Fe-2S] de GLRX5. Il peut alors être transféré aisément aux apo-protéines réceptrices *in vitro*, ce qui conforte le rôle de GLRX5 comme protéine de transport entre ISCU et les apo-protéines cibles physiologiques (Dutkiewicz & Nowak 2018) telles que les protéines mitochondriales de type [2Fe-2S] comme la ferrochélatase, et la sous-unité Rieske du complexe III.

Un modèle plus récent propose que des protéines de type LYR interviendraient dans le transport du centre Fe-S depuis holo-ISCU vers des apo-protéines cibles mitochondriales (Maio et al. 2014). Les protéines LYR peuvent également être elles-mêmes des protéines Fe-S. Elles possèdent un motif conservé LYR « Leucine – Tyrosine – Arginine », et une autre séquence consensus KK_nKK (Lysine - Lysine – n=6 à 10 - Lysine - Lysine). Ces deux motifs reconnaissent HSC20 et reçoivent le centre [2Fe-2S] de holo-ISCU (Figure 15). Parmi les protéines LYR, on retrouve des protéines d'assemblage ou des sous-unités des complexes II et III de la CRM comme la sous-unité SDHB du complexe II, la protéine SDHAF1 ou LYRM8 impliquée dans l'assemblage du complexe II (Ghezzi et al. 2009; Maio et al. 2016) ou la protéine LYRM7 pour l'assemblage du complexe III (Sánchez et al. 2013). Certaines protéines LYR du complexe I telles LYRM6 (NDUFA6) and LYRM3 (NDUFB9) pourraient également intervenir dans la maturation des sous-unités du complexe I à centres Fe-S (Maio et al. 2014).

2.2.3 Troisième étape : voies de maturation des protéines mitochondriales à centre Fe-S

Le transfert du centre Fe-S depuis GLRX5 jusqu'aux apo-protéines réceptrices mitochondriales correspond à l'étape de maturation. Cette étape requiert au moins 5 protéines (BOLA3, IBA57, ISCA1, ISCA2, NFU1). Les fonctionnalités de chacune ne sont pas encore complètement élucidées et l'étude de leur positionnement les unes par rapport aux autres dans cette étape de maturation fait partie intégrante des objectifs de ma thèse. Leur implication dans la biogenèse des centres Fe-S est plus

largement étudiée depuis que des déficits en ces protéines ont été décrits (Cameron et al. 2011). Ces anomalies entraînent des désordres mitochondriaux complexes et une symptomatologie clinique le plus souvent très sévère (voir paragraphe 4.2, p.61).

Les processus de maturation sont distincts selon le type d'apo-protéine cible. La maturation des protéines [2Fe-2S] requiert le transfert et l'insertion du centre [2Fe-2S] directement depuis GLRX5 ou par une protéine LYR. La maturation des protéines [4Fe-4S] est un processus plus complexe puisque le centre [4Fe-4S] est préalablement formé à partir de 2 centres [2Fe-2S] puis transféré et inséré au sein de l'apo-protéine [4Fe-4S] réceptrice.

Les voies d'incorporation des centres [2Fe-2S] au sein des apo-protéines mitochondriales sont décrites comme nécessitant les protéines LYR, IBA57, BOLA1 ou BOLA3. Le rôle de chacune de ces protéines reste mal connu à ce jour (Figure 16).

Les premières études ont montré que GLRX5 était le pivot central pour la distribution des centres [2Fe-2S] aux protéines cibles chez la levure (Mühlenhoff et al. 2003). En ce qui concerne la ferrocélatase, une interaction avec GLRX5 a été mise en évidence (Medlock et al. 2015), confortant le rôle de holo-GLRX5 comme source de son centre [2Fe-2S]. Cependant, les protéines de transfert du centre [2Fe-2S] ne sont pas clairement établies. Une hypothèse propose la protéine BOLA3 comme protéine de transfert, car elle est capable de lier holo-GLRX5 en formant, *in vitro*, un complexe ([2Fe-2S]-BOLA3)-GLRX5 moins stable que celui formé par une autre protéine de structure proche nommée BOLA1 (Nasta et al. 2017). Une autre étude suggère que la protéine IBA57 faciliterait l'insertion du centre [2Fe-2S] au sein de la protéine Rieske (Sánchez et al. 2018).

Ensuite, la découverte des protéines LYR a remis en cause le rôle de holo-GLRX5 comme unique source de centre [2Fe-2S] pour la maturation des protéines [2Fe-2S] mitochondriales. Le complexe [holo-ISCU]-HSC20-HSPA9 pourrait aussi être une autre source de centre [2Fe-2S], indépendante de GLRX5, pour la protéine Rieske via la protéine LYRM7. Cette protéine interagit avec le complexe [holo-ISCU]-HSC20-HSPA9, et sa liaison avec HSC20 permet l'insertion du centre Fe-S au sein

de la protéine Rieske (Figure 16) (Sánchez et al. 2013; Maio et al. 2014; Ciofi-Baffoni et al. 2018).

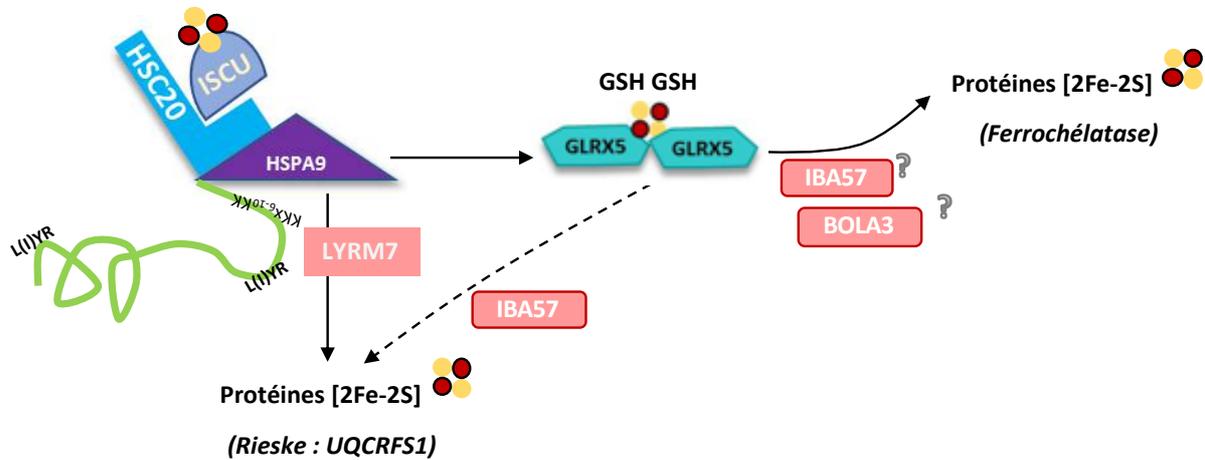


Figure 16: Voies de maturation des protéines [2Fe-2S] mitochondriales.

Les sources de centre [2Fe-2S] seraient les protéines holo-ISCU ou holo-GLRX5. Les protéines de transfert IBA57 et BOLA3 pourraient être les protéines de transfert entre holo-GLRX5 et les apo-protéines cibles (ferrochélatase et Rieske). La protéine LYRM7 serait dédiée à la maturation de la protéine Rieske depuis holo-ISCU.

La maturation des protéines [4Fe-4S] requiert la formation d'un centre [4Fe-4S] à partir de deux centres [2Fe-2S] puis le transfert de ce dernier vers les protéines réceptrices (LIAS, mt-aconitase, SDHB, protéines du complexe I...). Un des premiers modèles de la voie de maturation des protéines Fe-S suggérerait une étape d'assemblage du centre [4Fe-4S] sur les protéines ISCA1, ISCA2 et IBA57 (Paul & Lill 2014). Les protéines NFU1, BOLA3 et IND1 agiraient alors en aval de cette étape d'assemblage et seraient plutôt définies, dans ce modèle, comme des protéines de transfert du centre [4Fe-4S] vers les protéines cibles (Figure 17).

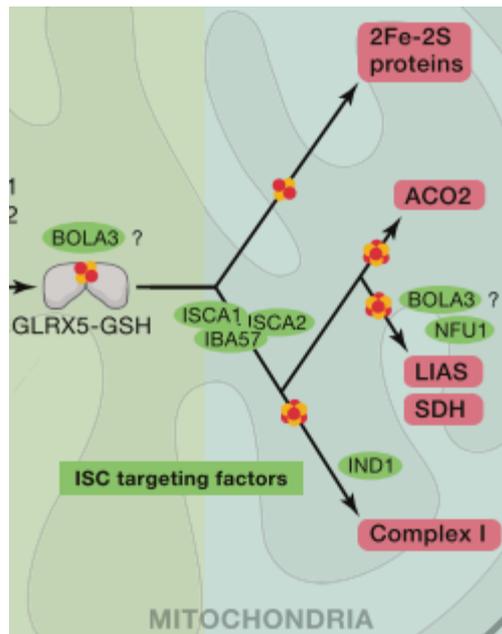


Figure 17 : Protéines impliquées dans la maturation des protéines Fe-S mitochondriales.

Ces protéines sont indiquées dans une ellipse verte, et les protéines Fe-S cibles sont dans les rectangles roses.
(Paul & Lill 2014)

- *Formation du centre [4Fe-4S]*

Il y a une dizaine d'années, l'implication des protéines Isa1 et Isa2 (*Iron-Sulfur cluster Assembly 1* et *Iron-Sulfur cluster Assembly 2*) et Iba57 (*Iron-sulfur cluster assembly factor for Biotin synthase and Aconitase-like mitochondrial proteins, with a mass of 57 kDa*) dans la formation des centres Fe-S a été mise en évidence chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Kaut et al. 2000; Pelzer et al. 2000; Gelling et al. 2008). Dans le système mammifère, le rôle de ces 3 protéines a été précisé dans la maturation des protéines [4Fe-4S] mitochondriales (Sheftel et al. 2012). Chez l'homme, des études biochimiques chez des patients présentant des pathologies avec déficit dans une de ces protéines ont suggéré que la protéine IBA57 serait impliquée uniquement dans la maturation des protéines à centres [4Fe-4S] (Ajit Bolar et al. 2013). En 2018, la description de patients atteints de déficit en ISCA1 ou ISCA2 laisse supposer que ces deux protéines sont également impliquées dans la maturation des protéines [4Fe-4S] mitochondriales (Torraco et al. 2018; Alaimo et al. 2018). *In vitro*, le rôle d'ISCA1 et ISCA2 dans la formation du centre [4Fe-4S] a été étudié récemment. Apo-ISCA1 et apo-ISCA2 sont capables de former un hétérodimère thermodynamiquement stable qui interagit avec deux molécules de

holo-GLRX5 pour capter les deux centres [2Fe-2S] et former un centre [4Fe-4S] (Banci et al. 2014; Brancaccio et al. 2014) (Figure 18). Pour cette étape, les trois résidus cystéine de chacune des deux protéines ISCA seraient indispensables pour extraire les centres [2Fe-2S] puis assurer la coordination du centre [4Fe-4S] (Brancaccio et al. 2017). Deux électrons sont nécessaires pour conduire à la formation du [4Fe-4S] (conversion de deux ions ferriques Fe^{3+} du centre [2Fe-2S] en ions ferreux Fe^{2+} dans le centre [4Fe-4S]) mais leur origine n'est pas connue (Ciofi-Baffoni et al. 2018).

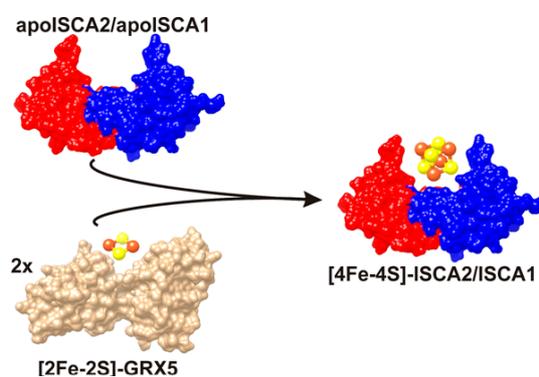


Figure 18 : Formation d'un centre [4Fe-4S] au sein du dimère ISCA2/ISCA1 à partir de deux molécules d'holo-GRX5.

En rouge : monomère d'ISCA2, en bleu : monomère d'ISCA1, en beige : la protéine GLRX5 dimérique (Brancaccio et al. 2014).

Une étude *in vivo* chez la souris (Beilschmidt et al. 2017) a remis en cause le modèle proposant la coopération entre les deux protéines ISCA1 et ISCA2 dans la formation du centre [4Fe-4S] (Brancaccio et al. 2014). La protéine ISCA1 aurait un rôle prépondérant alors qu'ISCA2 n'aurait pas de rôle dans l'étape finale de maturation des protéines Fe-S et ISCA1 et ISCA2 auraient des protéines partenaires distinctes. ISCA2 serait capable d'interagir avec IBA57 et GLRX5 tandis qu'ISCA1 interagirait avec la protéine NFU1, plutôt impliquée dans le transfert des centres [4Fe-4S] vers les protéines cibles.

Les deux modèles proposés suggèrent que la protéine IBA57 ne soit pas impliquée dans la formation du centre [4Fe-4S]. Cependant, un troisième modèle vient de mettre en évidence *in vitro* la formation d'un hétérodimère avec ISCA2 et

IBA57 (Gourdoupis et al. 2018). Chez la levure, les premières recherches montraient qu'Iba57 intervenait dans la maturation de protéines [4Fe-4S] (mt-aconitase et des enzymes à radical SAM (LIAS), SDHB et des sous-unités du complexe I) (Gelling et al. 2008). Par la suite, les premiers patients identifiés avec un déficit en IBA57 présentaient des défauts d'activité de l'aconitase mitochondriale, des complexes I et II de la chaîne respiratoire et des anomalies du métabolisme de l'acide lipoïque ce qui donnait un rôle pour IBA57 dans la maturation des protéines [4Fe-4S] (Ajit Bolar et al. 2013; Lossos et al. 2015; Debray et al. 2015). Plus récemment, une autre étude chez la levure va à l'encontre de ces conclusions en mettant en évidence le rôle d'Iba57 dans l'insertion du centre [2Fe-2S] au sein de la protéine Rieske, facilitant l'assemblage du complexe III et du supercomplexe formé par les complexes III et IV de la CRM (Sánchez et al. 2018). L'ensemble des études sur la protéine IBA57 n'a donc pas encore permis d'élucider sa fonction dans la maturation des protéines à centre [4Fe-4S] ou [2Fe-2S] (Figure 16 et Figure 17).

- Transfert du centre [4Fe-4S] vers les protéines cibles

Actuellement, les études sur les protéines NFU1, BOLA3 et NUBPL ont montré que ces protéines étaient impliquées dans le transfert du centre [4Fe-4S] vers les cibles mitochondriales.

La protéine NFU1 a été caractérisée puis étudiée chez l'Homme depuis quelques années (Tong et al. 2003). NFU1 a d'abord été identifiée chez la bactérie *Azotobacter vinelandii* (*NifU*) comme essentielle dans l'assemblage de centres Fe-S de la nitrogénase, par ses 4 résidus cystéine (Agar et al. 2000). Elle a été identifiée et appelée Nfu chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (Schilke et al. 1999) puis NFU (désormais NFU1) chez l'Homme (Tong et al. 2003). Son rôle comme protéine de transfert de centre [4Fe-4S] jusqu'à des protéines réceptrices a été suggéré chez l'Homme depuis sa caractérisation (Tong et al. 2003). Chez la levure, Nfu1 interagit avec les protéines Isa1 et Isa2 et des protéines à centre [4Fe-4S] comme l'aconitase mitochondriale, mais pas la protéine Rieske qui porte un [2Fe-2S] et Nfu1 protégerait le centre [4Fe-4S] des composés oxydatifs présents dans la mitochondrie (Melber et al. 2016). Récemment, l'étude structurale tridimensionnelle de la protéine NFU1

humaine a été réalisée (Cai et al. 2016). Le domaine C-terminal contient le motif CXXC, très conservé entre les espèces. Les deux résidus cystéine de ce motif sont indispensables à la liaison d'un centre Fe-S. NFU1 est sous forme dimérique, ce qui permet la coordination d'un centre [4Fe-4S] par les 4 résidus cystéine issus des motifs CXXC de deux sous-unités (Figure 19). De plus, la protéine adopte une structure trimérique de dimères, par interactions des dimères entre eux par leur domaine N-terminal. Chaque protéine peut ainsi porter 3 centres [4Fe-4S]. Chaque domaine C-terminal possède aussi un motif IYK (Isoleucine – Tyrosine – Lysine), domaine d'interaction avec la chaperone HSC20, qui pourrait guider la réaction de transfert du centre [4Fe-4S] vers les apo-protéines cibles (Cai et al. 2016).

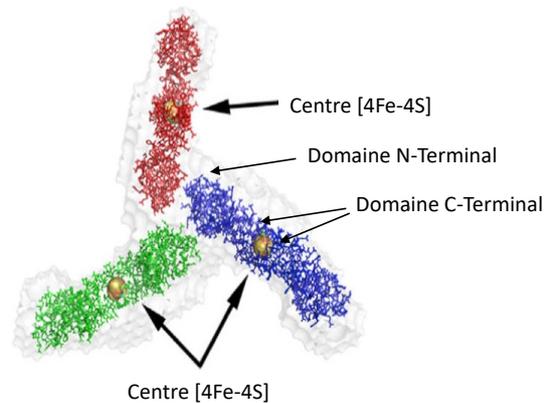


Figure 19 : Modélisation de la protéine holo-NFU1 formée de 3 dimères (rouge, vert et bleu), portant chacun un centre [4Fe-4S].

D'après (Cai et al. 2016)

NFU1 pourrait coopérer avec BOLA3 dans le transfert de centre [4Fe-4S] (Melber et al. 2016). La protéine BOLA3 a été étudiée depuis quelques années suite à la description de patients ayant un déficit en cette protéine menant à une pathologie neurologique très sévère (Seyda et al. 2001) proche de celle rapportée dans le déficit en NFU1 (Cameron et al. 2011; Baker et al. 2014).

BOLA3 appartient à la famille des protéines BOLA-like identifiées initialement chez les bactéries. Chez les eucaryotes, BOLA1 et BOLA3 sont toutes deux localisées dans la mitochondrie (Willems et al. 2013) et auraient des fonctions différentes et controversées. Chez la levure, l'étude des homologues Bol1 et Bol3 suggère un rôle

des deux protéines dans la maturation exclusive des protéines [4Fe-4S] mitochondriales avec Bol3 qui interviendrait dans la stabilisation de holo-Nfu1 (Uzarska et al. 2016). Bol3 pourrait aussi avoir un rôle dans le transfert du centre [2Fe-2S] entre holo-Grx5 (Figure 17) et une apo-protéine cible tandis que Bol1 a un rôle dans la régulation rédox (Willems et al. 2013) et le transfert d'électrons (Melber et al. 2016; Nasta et al. 2017) plutôt que dans la maturation des protéines Fe-S. Chez l'Homme, les déficits en NFU1 et BOLA3 entraînent un dysfonctionnement important des protéines [4Fe-4S] telles que LIAS ou SDHB (Ferrer-Cortès et al. 2012) confortant leur rôle dans la maturation des protéines [4Fe-4S].

En plus de NFU1 et BOLA3, la protéine NUBPL (anciennement IND1) interviendrait dans la maturation des protéines Fe-S. NUBPL est une protéine mitochondriale qui porte un motif CXXC en C-terminal impliqué dans la coordination d'un centre [4Fe-4S]. Chez la levure déficiente en NUBPL, seul l'assemblage du complexe I de la CRM fait défaut (Bych et al. 2008). Des études complémentaires ont ensuite mis en évidence une diminution de sous-unités à centres Fe-S du complexe I en l'absence de NUBPL. Cela suggère un rôle de NUBPL exclusivement dans la maturation des protéines Fe-S du complexe I, et probablement dans l'insertion de leurs centres Fe-S (Sheftel et al. 2009). Les premiers cas de déficits en NUBPL décrits chez l'homme associés à une analyse biochimique des complexes de la CRM montrent un déficit isolé en complexe I, avec absence de ses protéines Fe-S, ce qui induit un défaut d'assemblage du complexe I (Kevelam et al. 2013). NUBPL semble donc être une protéine dédiée au transfert de centre Fe-S au sein des protéines du complexe I.

3 Les protéines lipoylées : céto-acide déshydrogénases et le système de clivage de la glycine

Les protéines liées de manière covalente à l'acide lipoïque sont appelées protéines lipoylées. Ce sont des sous-unités de complexes enzymatiques impliqués dans le métabolisme énergétique (PDHc et KGDHc) et dans le catabolisme des acides aminés (*branch chain keto-acid dehydrogenase* BCKDHc, *oxoadipic dehydrogenase* OADHc et *glycine cleavage system* GCS) (Figure 20). L'acide

lipoïque est un cofacteur essentiel à la fonction catalytique de ces complexes enzymatiques sus-cités.

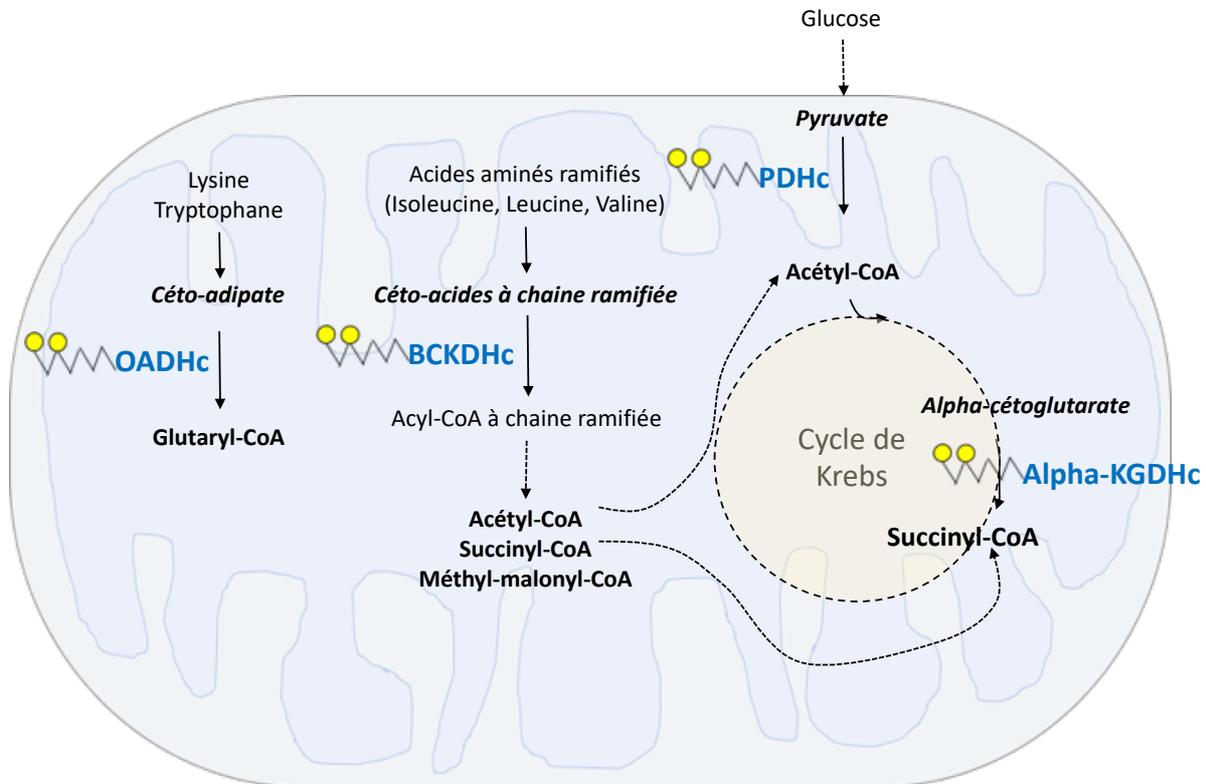


Figure 20 : Localisation des céto-acide déshydrogénases au sein de leurs voies métaboliques.

Ces protéines lipoylés (en bleu) portent un résidu lipoyl (ligne brisée avec deux ronds jaunes pour représenter les fonctions thiols).

3.1 L'acide lipoïque

3.1.1 *Structure et fonctions*

L'acide lipoïque (LA) ou acide 6,8-thioctique est présent chez les procaryotes et les eucaryotes. L'acide lipoïque possède deux résidus thiols (Figure 21). De par les propriétés oxydo-réductrices des atomes de soufre, l'acide lipoïque peut être oxydé ou réduit (acide dihydrolipoïque, DHLA), le conduisant à participer au recyclage d'autres antioxydants tels que les vitamines C et E, le GSH et le CoQ (Yi & Maeda 2005). La fonction acide de l'acide lipoïque forme une liaison amide avec le groupement $\epsilon\text{-NH}_2$ d'une lysine spécifique d'une sous-unité des complexes enzymatiques dont il est un cofacteur.

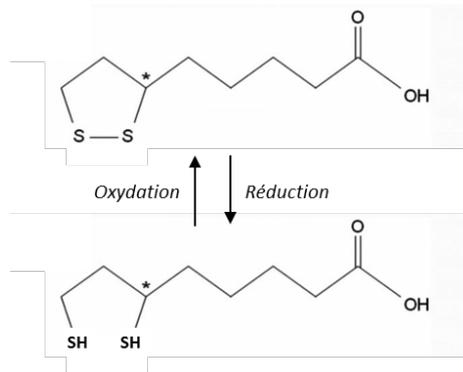


Figure 21 : Structure de l'acide lipoïque sous sa forme oxydée (LA) et réduite (DHLA).

L'acide lipoïque est essentiel à la survie chez les mammifères, et ce, dès le stade embryonnaire chez la souris (Yi & Maeda 2005). Il est l'un des plus puissants antioxydants naturels et un déficit total de synthèse induit un stress oxydatif majeur entraînant une augmentation des marqueurs de la peroxydation lipidique et une diminution de la concentration de GSH dans les globules rouges des embryons de souris dont le gène *Lias*, codant la lipoic acid synthase, a été inactivé. Ce stress oxydatif diminue après supplémentation exogène en acide lipoïque (Yi & Maeda 2005). En tant que cofacteur des céto-acide déshydrogénases mitochondriales, il est essentiel à l'oxydation de leur substrat, à la stabilisation et à la régulation rédox de ces enzymes (Solmonson & DeBerardinis 2018).

3.1.2 Synthèse de l'acide lipoïque

3.1.2.1 Chez les procaryotes

La synthèse d'acide lipoïque a été étudiée initialement chez *E. coli* (Cronan et al. 2005). Chez les procaryotes, l'acide lipoïque est synthétisé *de novo* ou bien recyclé par une voie enzymatique qui utilise le lipoyl-AMP comme substrat (Figure 22).

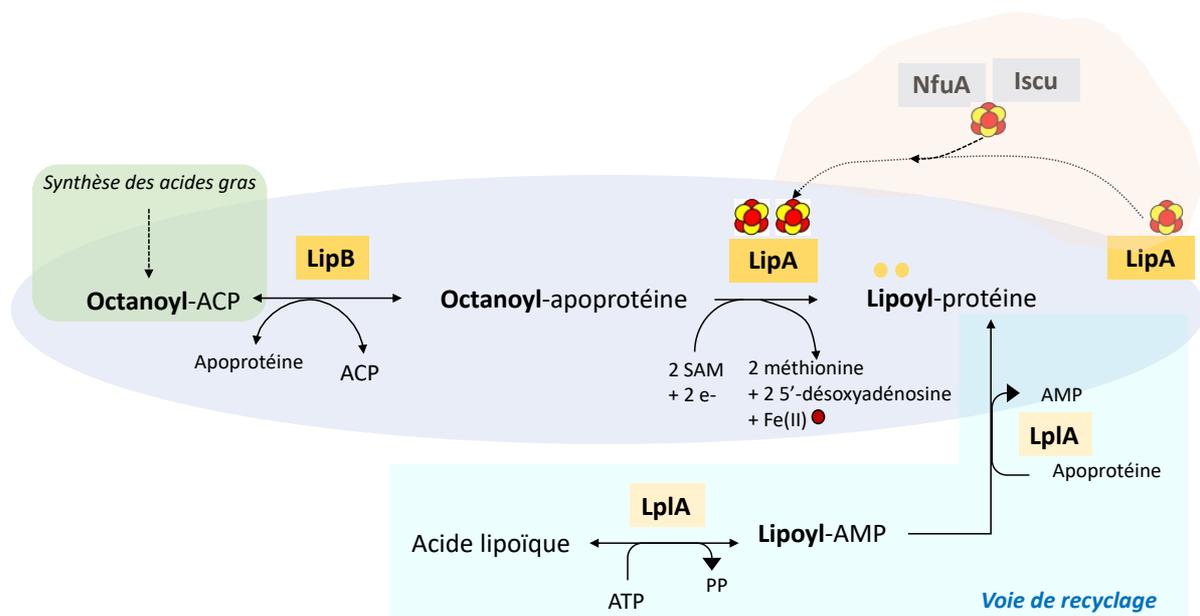


Figure 22 : Synthèse et recyclage de l'acide lipoiique chez les procaryotes

La biosynthèse du LA à partir de l'octanoyl-ACP requiert les deux enzymes LipB et LipA (fond gris). La voie de recyclage nécessite la LplA (fond turquoise). Les protéines NfuA et Iscu (fond orange) de la voie de biogenèse des centres Fe-S peuvent régénérer l'enzyme LipA en lui apportant un nouveau centre $[4\text{Fe-4S}]_{\text{AUX}}$, dégradé lors de la catalyse. Adapté d'après (Green et al. 1995; Christensen & Cronan 2010; Cronan 2014; McCarthy & Booker 2017).

L'acide octanoïque, synthétisé sur l'ACP (octanoyl-ACP), est le substrat de la biosynthèse de l'acide lipoiique. Il est un intermédiaire de la voie de synthèse des acides gras. Dans une première étape, il est transféré sur un résidu lysine de l'apoprotéine cible grâce à une transférase lipoyl(octanoyl)-ACP:protein transferase (LipB) (Christensen & Cronan 2010). Ensuite, la lipoyl synthase (LipA) catalyse l'insertion de deux atomes de soufre sur le groupement octanoyl. LipA appartient à la famille des enzymes à radical SAM. Elle contient deux centres $[4\text{Fe-4S}]$, l'un participant à la catalyse avec un radical SAM ($[4\text{Fe-4S}]_{\text{SAM}}$) tandis que l'autre est un centre dit « auxiliaire » ($[4\text{Fe-4S}]_{\text{AUX}}$). Le centre $[4\text{Fe-4S}]_{\text{AUX}}$ sert de donneur de soufre pour l'insertion des deux groupements thiols (-SH) sur les atomes de carbone C6 et C8 du résidu octanoyl, catalysée par LipA. Le centre $[4\text{Fe-4S}]_{\text{AUX}}$ est donc dégradé lors de la catalyse (Cronan 2014). Récemment, une étude a proposé que les protéines NfuA (homologue bactérien de NFU1) et Iscu (homologue bactérien de ISCU) seraient impliquées dans la régénération du centre $[4\text{Fe-4S}]_{\text{AUX}}$ (McCarthy & Booker 2017).

Une voie de recyclage du LA en deux étapes a été démontrée chez la bactérie conduisant à lipoyler une apo-protéine cible (Green et al. 1995). La lipoate ligase (LplA) fixe une molécule d'AMP sur une molécule d'acide lipoïque, formant le lipoyl-AMP. Ensuite, la LplA catalyse l'insertion du résidu lipoyl depuis le lipoyl-AMP sur une apo-protéine.

3.1.2.2 Chez les eucaryotes

*3.1.2.2.1 Synthèse de l'acide lipoïque chez la levure *S. cerevisiae**

Des protéines homologues des protéines bactériennes impliquées dans la synthèse de l'acide lipoïque ont été identifiées chez les eucaryotes. Chez *S. cerevisiae*, la voie de synthèse mitochondriale des acides gras de type II synthétise le résidu octanoyl lié à l'ACP, l'octanoyl-ACP, qui est le substrat pour la synthèse *de novo* du LA (Brody et al. 1997; Schonauer et al. 2008). Trois enzymes sont essentielles. Il s'agit de Lip2 (homologue de LipB), Lip5 (homologue de LipA) et Lip3 (homologue de LplA) (Tableau 2). La lipoylation des apo-protéines requiert une étape supplémentaire chez *S. cerevisiae* par rapport à *E. coli*, i) Lip2 et Lip5 ne sont pas suffisantes pour la synthèse de l'acide lipoïque ; ii) Lip3 ne permet pas à elle seule la lipoylation de protéines ; iii) la présence d'une protéine du système de clivage de la glycine est nécessaire à la synthèse d'acide lipoïque sur une apo-protéine (Schonauer et al. 2009). De plus, la voie de recyclage de l'acide lipoïque n'a pas été mise en évidence chez la levure (Solmonson & DeBerardinis 2018).

3.1.2.2.2 Synthèse du LA chez l'Homme

Chez l'Homme, la voie de synthèse de l'acide lipoïque est moins bien connue mais les protéines homologues de celles des bactéries et de la levure ont été identifiées (Tableau 2).

	Synthèse <i>de novo</i>			Voie de recyclage
	Octanoyltransférase	Lipoate synthase	Lipoyltransférase	Lipoate ligase
<i>E. coli</i>	LipB	LipA		LplA
<i>S. cerevisiae</i>	Lip2	Lip5	Lip3	
Homme	LIPT2	LIAS	LIPT1	

Tableau 2 : Enzymes impliquées dans la synthèse de l'acide lipoïque selon les espèces.

D'après (Solmonson & DeBerardinis 2018)

Ainsi, le modèle de la voie de synthèse de l'acide lipoïque chez l'Homme a été proposé d'après celle identifiée chez la levure. Une étude chez le bœuf a confirmé que l'acide octanoïque provenait également de la synthèse mitochondriale *de novo* des acides gras (Witkowski et al. 2007). Récemment, des patients présentant une encéphalopathie sévère causée par des mutations dans les gènes codant les protéines LIPT1, LIAS et LIPT2 ont été décrits (Soreze et al. 2013; Tort et al. 2014; Baker et al. 2014; Habarou et al. 2017). L'étude biochimique dans les fibroblastes de ces patients montraient des défauts de lipoylation de protéines. Ces résultats ont permis de conforter le rôle de ces protéines dans la synthèse de l'acide lipoïque chez l'Homme. Cette voie de synthèse nécessite donc trois étapes enzymatiques (Figure 23) :

- 1) L'acide octanoïque issu de la synthèse mitochondriale des acides gras est lié à l'ACP (octanoyl-ACP) puis transféré sur la sous-unité H du système de clivage de la glycine (octanoyl-H) par la lipoyltransférase 2, LIPT2.
- 2) L'octanoyl-H va ensuite recevoir deux groupements thiols sur les carbones C6 et C8 du résidu octanoyl par LIAS. C'est une enzyme à radical SAM portant deux centres [4Fe-4S], essentiels à sa fonctionnalité, comme son homologue bactérienne. Le centre [4Fe-4S]_{AUX}, détruit lors de la catalyse, pourrait être régénéré au sein de LIAS par l'action de NFU1 et/ou ISCU, par analogie avec le modèle bactérien (McCarthy & Booker 2017). Après lipoylation, la sous-unité H du système de clivage de la glycine est alors fonctionnelle.
- 3) La dernière étape est nécessaire pour la lipoylation d'autres apo-protéines à partir de lipoyl-H. La lipoyltransférase 1, LIPT1, catalyse le transfert du

groupement lipoyl depuis lipoyl-H vers les apo-protéines cibles, c'est-à-dire la sous-unité E2 des céto-acide déshydrogénases.

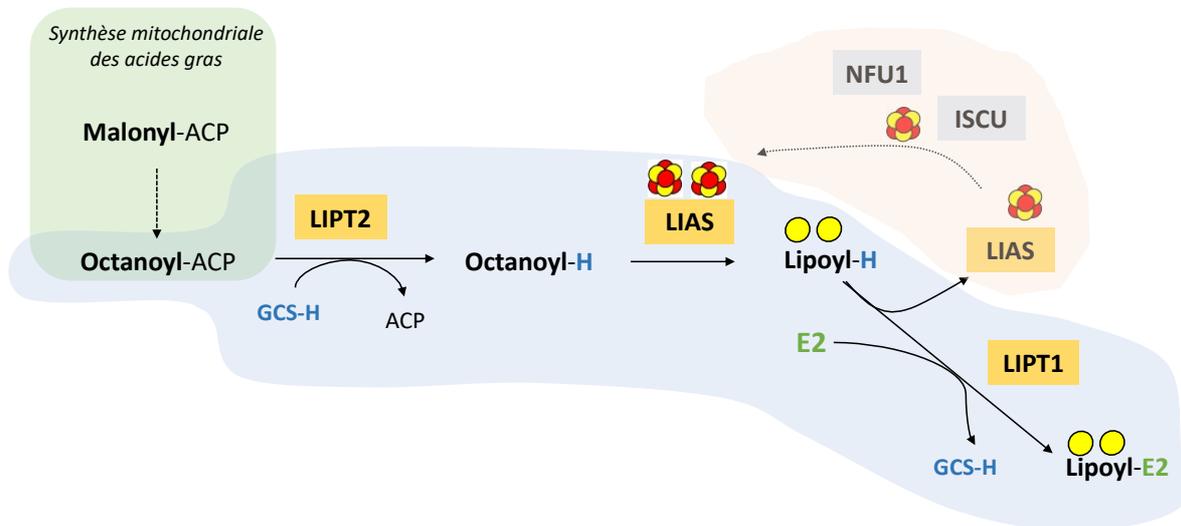


Figure 23 : Synthèse de l'acide lipoïque chez l'Homme.

La synthèse de l'acide octanoïque est représentée sur fond vert. La voie de synthèse de l'acide lipoïque sur la sous-unité H du système de clivage de la glycine (H et GCS-H) et de transfert sur les sous-unités E2 des céto-acide déshydrogénases (E2) est représentée sur fond gris. La voie possible de réparation du centre [4Fe-4S] de LIAS par ISCU et NFU1 est figurée sur fond orange. Les cercles jaunes représentent les groupements thiols de l'acide lipoïque. Adapté d'après (Soreze et al. 2013; Tort et al. 2014; McCarthy & Booker 2017).

3.2 Les céto-acide déshydrogénases et le système de clivage de la glycine

Les céto-acide déshydrogénases sont des complexes enzymatiques situés dans la matrice mitochondriale. Ces enzymes catalysent la décarboxylation associée à une oxydation de substrats. Il s'agit des complexes PDHc, KGDHc, BCKDHc, OADHc et du GCS qui ont pour substrats respectifs le pyruvate, l'alpha-cétoglutarate, des céto-acides issus du catabolisme des acides aminés branchés, le céto-adipate et la glycine (Mayr et al. 2014). Ces complexes enzymatiques sont composés de trois sous-unités catalytiques nommées E1, E2 et E3 pour PDHc, KGDHc, BCKDHc, et l'OADHc. Le GCS a une structure légèrement différente et sera présentée dans le paragraphe 3.2.3 de ce chapitre (p.58). Bien que ces complexes enzymatiques aient

une structure semblable et le LA comme cofacteur enzymatique commun, ils sont impliqués dans des métabolismes différents (Figure 20).

La réaction catalytique effectuée par les céto-acide déshydrogénases se déroule en plusieurs étapes (Figure 24). Les trois sous-unités des céto-acide déshydrogénases possèdent chacune leur fonction catalytique spécifique. La sous-unité E1 permet la décarboxylation du substrat avec l'aide d'un cofacteur, le thiamine pyrophosphate (TPP). La sous-unité E2 va ensuite oxyder le substrat qui a perdu son groupement COOH. Cette réaction requiert l'acide lipoïque, cofacteur lié à E2 par liaison covalente. Ensuite, l'intermédiaire réactionnel (R-C(-OH)=TPP) est transféré sur le coenzyme A (CoA-SH). Cette réaction de transacylation va libérer un ester de coenzyme A (R-C(=O)-S-CoA). La sous-unité E3 est utile à la réoxydation de l'acide lipoïque, par réduction du FAD en FADH₂, lui-même ensuite réoxydé par le NAD⁺. La sous-unité E3 est commune aux quatre céto-acide déshydrogénases. Au total, ces complexes enzymatiques réalisent une décarboxylation oxydative de leur substrat, dépendante de la disponibilité de 4 cofacteurs (TPP, LA, NAD⁺, FAD). Les spécificités de chaque complexe enzymatique vont être présentées ci-après.

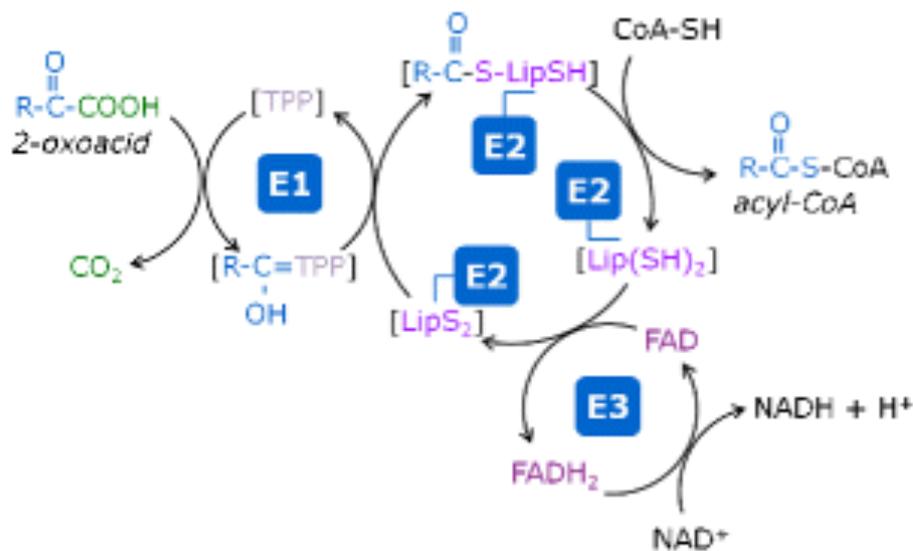


Figure 24 : Structure et réactions de décarboxylation oxydative des céto-acide déshydrogénases.

PDHc (R=H₃C-), α-KGDHc (R= COOH-CH₂-CH₂-), BCKDHc (R=(CH₃)₂CH-, CH₃CH₂CH(CH₃) - ou CH₃CH₂CH(CH₃)CH₂-), OADHc (R= COOHCH₂ CH₂ CH₂-), composées des sous-unités E1, E2 et E3. Le cofacteur de la sous-unité E1 est le thiamine pyrophosphate (TPP). Le cofacteur covalent de la sous-unité E2 est l'acide lipoïque (LipS₂ à l'état oxydé et Lip(SH)₂ à l'état réduit) et le coenzyme A (CoA-SH) est nécessaire à la formation du produit de la réaction, l'acyl-CoA. (Mayr et al. 2014).

3.2.1 Le complexe PDHc

3.2.1.1 Fonction

Le complexe PDHc intervient dans le métabolisme oxydatif du glucose car il relie la voie de la glycolyse au cycle de Krebs par la production d'acétyl-coA à partir du pyruvate (Patel et al. 2014). A la suite de la glycolyse cytosolique, le pyruvate emprunte le transporteur mitochondrial du pyruvate (MPC) (Bricker et al. 2012) pour entrer dans la mitochondrie. Les enzymes du carrefour du pyruvate (PDHc et pyruvate carboxylase) sont hautement régulées. En fonction des besoins énergétiques de la cellule, le pyruvate est métabolisé par le PDHc afin de produire des métabolites pour la synthèse d'ATP ou par la pyruvate carboxylase pour initier la néoglucogenèse.

3.2.1.2 Structure

En plus des sous-unités catalytiques E1, E2 et E3 retrouvées chez les céto-acide déshydrogénases, PDHc comporte une sous unité non catalytique appelée E3BP (*E3-binding protein*). E3BP et la sous-unité E2 forment le noyau, de forme pentagonale dodécaédrique, sur lesquelles les sous-unités périphériques E1 et E3 sont liées par liaison non covalente (Figure 25) (Vijayakrishnan et al. 2010). E3BP est structuralement proche d'E2 et possède une molécule d'acide lipoïque lié à une lysine (au lieu de deux molécules sur E2), mais E3BP n'a pas de fonction catalytique. Elle est codée par le gène *PDHX* (chromosome 11). La sous-unité E2 est appelée dihydrolipoamide acétyltransférase et codée par le gène *DLAT* (chromosome 11). La sous-unité E1 est la pyruvate déshydrogénase, il s'agit d'un tétramère $\alpha_2\beta_2$ composé de 2 sous-unités E1 α et E1 β . La sous-unité E1 α est codée par le gène *PDHA1* (chromosome X) et la sous-unité E1 β est codée par le gène *PDHB* (chromosome 3). La sous-unité E3 est un homodimère commun à toutes les céto-acide déshydrogénases, codée par le gène *DLD* (chromosome 7). Au sein du complexe

PDHc, elle interagit avec la sous-unité E3BP grâce à des liaisons électrostatiques et hydrophobes (Patel et al. 2014).

Le complexe PDHc est une macromolécule d'environ 10 000 kDa composée de 60 multimères du noyau (E2 et E3BP) et 30 hétérotétramères $\alpha_2\beta_2$ de la sous-unité E1 et 6 homodimères de E3. Le nombre de sous-unités de E2 (40 ou 48) et de E3BP (20 ou 12) reste à définir (Vijayakrishnan et al. 2010; J. Guo et al. 2017) mais le modèle avec 48 sous-unités E2 et 12 sous-unités E3BP semble le plus probable (Hezaveh et al. 2018).

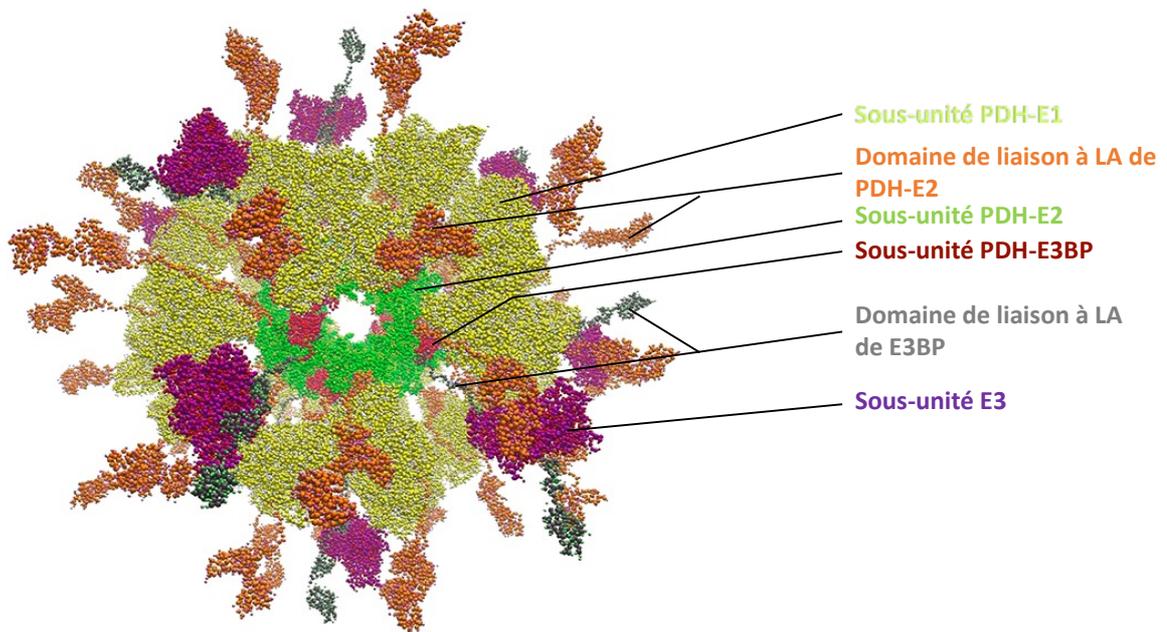


Figure 25 : Modélisation du complexe PDHc avec 48 sous-unités E2 associées à 12 sous-unités E3BP.

Le noyau est formé de la sous-unité E2 (vert), et de la sous-unité E3BP (rouge). Les bras lipoylés de E2 (orange) se lient aux tétramères de E1 (jaune) tandis que le bras lipoylé de E3BP (gris) interagit avec l'homodimère de E3 (violet) (Hezaveh et al. 2018).

3.2.2 Les complexes *KGDHc*, *BCKDHc* et *OADHc*

3.2.2.1 *KGDHc*

Le complexe *KGDHc* catalyse la décarboxylation oxydative de l'alpha-céto glutarate en succinyl-coA dans le cycle de Krebs. Le complexe *KGDHc* a un poids moléculaire d'environ 3 200 kDa. Il est formé d'un noyau octaédrique de 24 sous-

unités E2 (chacune d'environ 50 kDa), associé à 6 sous-unités E1 et d'une sous-unité E3. La sous-unité E1 (E1o) est codée par le gène *OGDH* (chromosome 7) et la sous-unité E2 (E2o) par le gène *DLST* (chromosome 14) (Armstrong et al. 2014).

3.2.2.2 Les complexes BCKDHc et OADHc

Ces deux complexes enzymatiques font partie du catabolisme oxydatif des acides aminés.

Le complexe BCKDHc est une macromolécule de 4 000 kDa composée de 3 sous-unités catalytiques : E1b (codée par *BCKDHA*, chromosome 19), E2b (codée par *BCKDHB*, chromosome 6) sur laquelle deux molécules d'acide lipoïque sont fixées et E3. En amont du complexe BCKDHc, la valine, la leucine et l'isoleucine sont métabolisées par une aminotransférase (BCAT) en céto-acides, respectivement le 3-méthyl-2-cétobutanoate, le 4-méthyl-2-cétopentanoate et le 3-méthyl-2-cétopentanoate. Ceux-ci vont être décarboxylés en acyl-CoA respectifs par BCKDHc.

Le complexe OADHc catalyse la décarboxylation oxydative du céto-adipate en glutaryl-CoA. Le céto-adipate est un métabolite du catabolisme mitochondrial de la lysine (Danhauser et al. 2012) et du tryptophane (Colabroy & Begley 2005). Le céto-adipate peut également être métabolisé par le complexe KGDHc (Danhauser et al. 2012) ce qui remet en cause la fonction du complexe OADHc, peu étudié dans la littérature.

Les complexes BCKDHc et OADHc n'ont pas été étudiés dans ce travail car le service de biochimie de l'hôpital Bicêtre est spécialisé dans l'étude du complexe PDHc et des enzymes du cycle de Krebs dont le complexe KGDHc. Les mesures des activités enzymatiques des complexes BCKDHc et OADHc n'étant pas disponibles au sein du laboratoire, elles n'ont pas été mises au point pour la réalisation de ce travail puisque nous disposons des techniques de mesure de l'activité de deux autres enzymes lipoylées (PDHc et KGDHc).

3.2.3 Le système de clivage de la glycine

La glycine est le plus simple des acides aminés et possède plusieurs voies de catabolisme. La principale voie est catalysée par le GCS. Elle conduit à une décarboxylation oxydative en ammoniaque (NH_3), CO_2 et groupement méthylène accepté par le tétrahydrofolate (THF) (Figure 26). En cas de dysfonctionnement du GCS, la concentration de la glycine augmente dans les liquides biologiques (Sato et al. 1991)

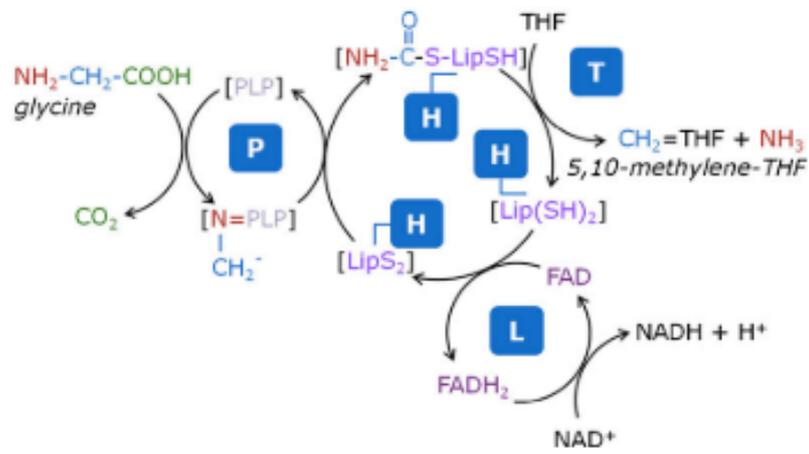


Figure 26 : Structure et fonctions du GCS.

Le cofacteur de la sous-unité P est le pyridoxal 5'phosphate (PLP). Le cofacteur covalent de la sous-unité H est l'acide lipoïque (LipS_2 à l'état oxydé et Lip(SH)_2 à l'état réduit). L'accepteur du méthylène, produit de la réaction est le tétrahydrofolate (THF) porté par la sous-unité T. La sous-unité L catalyse l'oxydation de l'acide lipoïque avec deux cofacteurs : le FAD et le NAD^+ (Mayr et al. 2014).

Le complexe GCS est composé de 3 sous-unités catalytiques (sous-unités P, H et L) et d'une sous-unité structurale (sous-unité T) (Kure et al. 2001). Il a une structure proche de celle des céto-acide déshydrogénases mais n'a pas de sous-unité commune avec elles. La nature de la sous-unité L, qui a la même fonction que la sous-unité E3 des céto-acide déshydrogénases, n'est pas clairement connue (Mayr et al. 2014). De plus, il ne possède pas le thiamine pyrophosphate comme cofacteur de la sous-unité P mais le pyridoxal-5'-phosphate. Contrairement aux céto-acide déshydrogénases, le clivage de la glycine par le GCS est une réaction enzymatique complexe réversible. Ce complexe enzymatique est principalement exprimé dans le

foie et son activité ne peut être dosée dans les fibroblastes (Zay et al. 2011). Le GCS n'a donc pas été étudié dans ce travail.

4 Pathologies liées à un déficit dans la voie de synthèse de l'acide lipoïque ou de la biogenèse des protéines Fe-S

Pour la plupart des protéines impliquées dans la voie de biogenèse des protéines Fe-S et de l'acide lipoïque, un déficit avec mutation du gène correspondant a été décrit au moment où j'ai commencé mon travail de thèse.

Les anomalies dans la voie de synthèse de l'acide lipoïque entraînent un défaut de lipoylation des complexes PDHc, KGDHc, BCKDHc avec ou sans atteinte du GCS. Cliniquement, les pathologies causées par un défaut de la voie de synthèse de l'acide lipoïque vont donc associer les signes clinico-biologiques des déficits en PDHc, KGDHc, BCKDHc et/ou GCS (régression psycho-motrice, hyperlactatémie, hyperglycinémie sans cétose, leucodystrophie).

Les anomalies dans la voie de biogenèse des protéines Fe-S impactent la fonctionnalité d'une ou plusieurs apo-protéines cibles. Ainsi, le phénotype clinique est variable, allant de l'anémie sidéroblastique, à la myopathie, ou à des syndromes de dysfonctionnements mitochondriaux multiples (MMDS) lorsque plusieurs apo-protéines cibles sont déficitaires en centre [4Fe-4S] (sous-unités de complexes de la CRM, LIAS, mt-aconitase).

Toutes ces maladies sont des pathologies très rares. La plus fréquente est l'ataxie de Friedreich causée par une mutation dans le gène de la frataxine tandis que pour les autres, le nombre de cas décrits se limite à quelques cas. Elles sont de transmission autosomique récessive pour la quasi-totalité d'entre elles.

4.1 Anomalies dans la voie de lipoylation des protéines

La voie de lipoylation des protéines requiert l'action coordonnée de deux transférases (LIPT1 et LIPT2) et d'une enzyme à centres [4Fe-4S] (LIAS) à partir de l'acide octanoïque. Comme présenté plus haut, l'acide lipoïque est un cofacteur essentiel à la fonction des complexes qui le portent : PDHc, KGDHc, BCKDHc et GCS. Ainsi, une anomalie dans les protéines LIPT1, LIPT2 ou LIAS va entraîner des dysfonctions majeures de ces complexes enzymatiques avec une symptomatologie clinique et radiologique à l'IRM évocatrice d'un déficit en PDHc et d'une hyperglycinémie sans cétose par dysfonction du GCS. Les analyses biochimiques vont mettre en évidence une augmentation des substrats de ces enzymes (pyruvate et lactate, glycine, alpha-cétoglutarate) dans le sang, les urines et/ou le liquide céphalo-rachidien (LCR), suggérant une anomalie de lipoylation des protéines. Dans le déficit en LIPT1, contrairement au déficit en LIPT2, la lipoylation de la sous-unité H du GCS n'est pas affectée (Figure 23), donc les taux de glycine dans le sang et le LCR restent normaux.

Des anomalies dans les gènes codant les protéines LIAS et LIPT1 ont été décrites depuis 2011. Le Tableau 3 répertorie les différents signes cliniques, radiologiques et biologiques de ces déficits rapportés au moment où j'ai débuté mon travail de thèse.

Pathologie (gène, OMIM)	Phénotype clinique, imagerie cérébrale et anomalies biologiques	Cas décrits (Références)
Déficit en LIAS Hyperglycinémie, acidose lactique et convulsions (<i>LIAS</i> , 614462)	<ul style="list-style-type: none"> - Hypotonie, convulsions, ou encéphalopathie aiguë avec mouvements anormaux. - Atrophie cérébrale, kystes. - Hyperglycinémie, hyperglycorrachie. Diminution de la lipoylation des protéines. 	4 cas (Mayr et al. 2011; Baker et al. 2014; Tsurusaki et al. 2015)
Déficit en LIPT1 (<i>LIPT1</i> , 616299)	<ul style="list-style-type: none"> - Retard psycho-moteur, tétraparésie ou défaillance multiviscérale aiguë avec acidose lactique, hypertension pulmonaire. - Atrophie cérébrale, retard de myélinisation. - Acidose lactique. Activité GCS normale, pas d'hyperglycinémie. Activités PDHc, KGDHc, BCKDHc diminuées. 	2 cas (Soreze et al. 2013; Tort et al. 2014)

Tableau 3 : Présentation clinique, radiologique et biologique des déficits dans la voie de lipoylation de protéines décrits au début de mon travail de thèse en 2015

En 2016, deux nouveaux cas de déficit en LIPT1 ont été décrits (Taché et al. 2016). En 2017, trois cas de déficits en LIPT2 ont été rapportés (Habarou et al. 2017), dont le patient P2 étudié dans mon travail de thèse.

4.2 Anomalies dans la voie de biogenèse des protéines Fe-S

4.2.1 *Déficits dans les étapes précoces de biogenèse mitochondriale des centres Fe-S*

Les pathologies causées par une anomalie dans un gène codant une protéine impliquée dans la voie de synthèse *de novo* du centre [2Fe-2S] et dans son transfert jusqu'aux protéines cibles déjà décrites sont présentées dans le Tableau 4.

Pathologie (gène, OMIM)	Phénotype clinique, imagerie cérébrale et anomalies biologiques	Cas décrits (Références)
Déficit en FDX2 Myopathie mitochondriale par déficit en FDX2 (FDX1L ou FDX2 , 614585)	<ul style="list-style-type: none"> - Myopathie avec acidose lactique, rhabdomyolyse aiguë. - Acidose lactique, augmentation de la CK lors des épisodes aigus. FGF-21 augmenté. Diminution de l'activité des complexes I, II et III de la CRM dans le muscle. 	1 cas (Spiegel et al. 2014)
Déficit en frataxine Ataxie de Friedreich (FXN , 606829)	<ul style="list-style-type: none"> - Maladie neurodégénérative avec ataxie progressive, cardiopathie, scoliose, atrophie optique. - Atrophie de la moelle épinière cervicale. - Diminution de l'activité des complexes I, II et III de la CRM, de l'aconitase mitochondriale et cytosolique. 	Prévalence 1/50 000 (Pandolfo 2008)
Déficit en GLRX5 Anémie sidéroblastique (GLRX5 , 609588) Spasticité infantile avec hyperglycinémie (GLRX5 , 616859)	<p>Deux <i>phénotypes</i> :</p> <ul style="list-style-type: none"> - Anémie sidéroblastique avec surcharge cellulaire en fer. - Activité aconitase cytosolique diminuée. - Spasticité avec troubles de la marche, troubles visuels. - Leucodystrophie, atrophie du corps calleux, lésions de la moelle épinière supérieure. - Hyperglycinémie, activité PDHc diminuée. 	2 cas (Camaschella et al. 2007; Liu et al. 2014) 3 cas (Baker et al. 2014)

Pathologie (gène, OMIM)	Phénotype clinique, imagerie cérébrale et anomalies biologiques	Cas décrits (Références)
Déficit en HSPA9 Anémie sidéroblastique (<i>HSPA9</i> , 182170)	<ul style="list-style-type: none"> - Anémie avec sidéroblastes dans la moelle osseuse. - Retard de croissance intra-utérin, dysmorphie des oreilles, du nez et anomalies des épiphyses et des vertèbres avec retard d'ossification et dysplasie (EVEN-PLUS syndrome), cardiomyopathie, néphropathie 	<p>21 cas (Schmitz-Abe et al. 2015)</p> <p>3 cas (Royer-Bertrand et al. 2015)</p>
Déficit en ISCU Myopathie par déficit en ISCU (<i>ISCU</i> , 255125)	<ul style="list-style-type: none"> - Myopathie avec acidose lactique évoluant par poussées. Intolérance à l'exercice, cardiomyopathie hypertrophique. - Hyperlactatémie. Activités des complexes I, II et III et de mt-aconitase diminuées. 	<p>23 cas (Mochel & Haller 2009)</p>
Déficit en ISD11 Déficit combiné des OXPHOS (<i>LYRM4</i> , 615595)	<ul style="list-style-type: none"> - Acidose lactique néonatale sévère. - Diminution de l'activité des complexes I, II et III de la CRM et d'autres protéines Fe-S mitochondriales et cytosoliques. 	<p>2 cas apparentés (Lim et al. 2013)</p>
Déficit en NFS1 Déficit des complexes II et III (<i>NFS1</i> , absence d'OMIM)	<ul style="list-style-type: none"> - Acidose lactique, hypotonie, épilepsie, défaillance multi-organes. - Diminution de l'activité des complexes II et III de la CRM. Mitochondries de morphologie anormale. Hyperlactatémie, élévation des enzymes hépatiques et musculaire. 	<p>3 cas apparentés (Farhan et al. 2014)</p>
Déficit en LYRM7 Déficit mitochondrial du complexe III nucléaire de type 8 (<i>LYRM7</i> , 615838)	<ul style="list-style-type: none"> - Leucoencéphalopathie sévère, retard de développement, régression neurologique - Anomalies de signal progressives avec cavités multifocales dans la substance blanche périventriculaire et profonde. - Déficit isolé du complexe III de la CRM. 	<p>1 cas (Invernizzi et al. 2013)</p>

Tableau 4 : Pathologies causées par une anomalie dans une protéine impliquée dans la synthèse *de novo* du centre [2Fe-2S] ou dans le transport du centre [2Fe-2S] vers l'apo-protéine cible, décrites au début de mon travail de thèse en 2015.

Dans les anomalies de synthèse *de novo* du centre [2Fe-2S], une surcharge cellulaire en fer est présente, causant des troubles musculaires et/ou hématologiques et un dysfonctionnement de l'ensemble des protéines [2Fe-2S] et [4Fe-4S] mitochondriales et extramitochondriales. Une myopathie est le signe d'appel pour un déficit en ISCU ou FDX1L tandis que l'ataxie ou la spasticité sont majeures dans les déficits en frataxine ou GLRX5. Une anémie sidéroblastique est le signe clinique présent dans certains déficits en GLRX5 et dans le déficit en HSPA9. Le déficit en

ABCB7 associe ataxie et anémie sidéroblastique (OMIM 301310). Les autres pathologies (déficit en ISD11 et NFS1) sont plutôt évocatrices d'une cytopathie mitochondriale puisqu'elles associent une acidose lactique sévère avec défaillance multi-organes par déficit énergétique important.

A ce jour, une nouvelle mutation dans le gène FDX2 (c.431C4T, p.Pro144Leu) a été répertoriée dans deux familles brésiliennes (Gurgel-Giannetti et al. 2018), et six nouveaux cas de déficit en LYRM7 ont été décrits (Dallabona et al. 2016; Kremer et al. 2016; Hempel et al. 2017). Aucun déficit congénital de la mitoferrine 2, impliquée dans l'import de fer dans la mitochondrie, n'a encore été rapporté.

4.2.2 Déficiets dans les étapes tardives de maturation des protéines [4Fe-4S] mitochondriales

Les anomalies par mutation d'un gène codant une protéine impliquée dans la voie d'assemblage (ISCA1, ISCA2) et de transport (IBA57, BOLA3, NFU1, NUBPL) du centre [4Fe-4S] au sein des apo-protéines cibles vont entraîner un dysfonctionnement de celles-ci. Ainsi, des protéines [4Fe-4S] appartenant aux complexes I et II de la CRM, au cycle de Krebs (mt-aconitase) et la protéine LIAS essentielle à la lipoylation des céto-acide déshydrogénases peuvent être impactées et induire de multiples dysfonctionnements mitochondriaux. C'est ainsi que les premiers déficits en NFU1 (Seyda et al. 2001), dont la confirmation génétique a été ultérieure (Cameron et al. 2011), ont été décrits. Le syndrome MMDS est une anomalie sévère du métabolisme énergétique, qui induit des troubles respiratoires, un défaut de développement neurologique, une acidose lactique, un faible tonus musculaire et un décès précoce. La symptomatologie clinique est associée à des anomalies biochimiques multiples assez caractéristiques du MMDS : déficit en complexes I et II de la chaîne respiratoire et anomalie de lipoylation des enzymes mitochondriales qui entraîne un déficit en PDHc, KGDHc et BCKDHc. Quatre types de MMDS ont été décrits. Ils correspondent respectivement aux déficits en NFU1, BOLA3, IBA57 et ISCA2 (Tableau 5). Le déficit en NUBPL, protéine impliquée exclusivement dans le transport des centres Fe-S vers les apo-protéines du

complexe I, entraîne une symptomatologie classique des cytopathies mitochondriales, avec déficit isolé du complexe I.

Pathologie (gène, OMIM)	Phénotype clinique, imagerie cérébrale et anomalies biologiques	Cas décrits (Références)
Déficit en NFU1 MMDS de type 1 (NFU1 , 605711)	<ul style="list-style-type: none"> - MMDS de début précoce, très sévère, hypertension pulmonaire (fonction de la mutation génétique), spasticité parfois prépondérante. - Leucodystrophie vacuolée ou kystique, atrophie cérébrale. - Diminution de l'activité des complexes I et II de la CRM, de la mt-aconitase, du complexe PDH et anomalies de la lipoylation des protéines. Hyperglycinémie. Diminution de l'activité mt-aconitase. 	22 cas (Cameron et al. 2011; Navarro-Sastre et al. 2011; Nizon et al. 2014; Invernizzi et al. 2014; Tonduti et al. 2015; Ahting et al. 2015)
Déficit en BOLA3 MMDS de type 2 (BOLA3 , 614299)	<ul style="list-style-type: none"> - MMDS de début précoce, atteinte très sévère (décès avant 2 ans), avec cardiomyopathie, épilepsie. - Anomalies de la substance blanche profonde, lésions céphalorachidiennes diffuses - Diminution de l'activité des complexes I et II de la CRM, de la mt-aconitase, du complexe PDH et anomalies de la lipoylation des protéines. Hyperglycinémie. Diminution de l'activité mt-aconitase. 	6 cas (Cameron et al. 2011; Haack et al. 2013; Baker et al. 2014)
Déficit en IBA57 MMDS de type 3 (IBA57 , 615330)	<ul style="list-style-type: none"> - Myopathie et encéphalopathie sévère ou paraplégie spastique avec atrophie optique. - Leucodystrophie. - Diminution de l'activité des complexes I et II de la CRM et anomalies de la lipoylation des protéines. Hyperglycinémie variable. Diminution de l'activité mt-aconitase variable. 	15 cas (Ajit Bolar et al. 2013; Lossos et al. 2015; Debray et al. 2015)
Déficit en ISCA2 MMDS de type 4 (ISCA2 , 616370)	<ul style="list-style-type: none"> - Régression neurologique, spasticité, atrophie optique, nystagmus. - Leucodystrophie diffuse. - Diminution inconstante de l'activité des complexes I, II et IV de la CRM. Anomalies de la lipoylation des protéines. Hyperglycinémie. 	6 cas (Al-Hassnan et al. 2015)

Pathologie (gène, OMIM)	Phénotype clinique, imagerie cérébrale et anomalies biologiques	Cas décrits (Références)
Déficit en NUBPL Déficit en complexe I (<i>NUBPL</i> , 613621)	<ul style="list-style-type: none"> - Retard de développement moteur, myopathie, ataxie. - Leucodystrophie ou leucoencéphalopathie caractéristique. - Diminution de l'activité du complexe I de la CRM. 	7 cas (Calvo et al. 2010; Kevelam et al. 2013)

Tableau 5 : Pathologies associées à un déficit dans la voie d'assemblage et de transport du centre [4Fe-4S] aux apo-protéines cibles mitochondriales décrites au début de mon travail de thèse en 2015.

Depuis 2016, quatre nouveaux patients avec un déficit en NFU1 (Ferrer-Cortès et al. 2016; Jin et al. 2017), vingt nouveaux cas de déficit en IBA57 (Ishiyama et al. 2017; Torraco et al. 2017; Hamanaka et al. 2018; Liu et al. 2018) et treize nouveaux patients avec un déficit en ISCA2 (Alfadhel et al. 2018; Alaimo et al. 2018; Toldo et al. 2018) ont été décrits. De plus, un cinquième type de MMDS (MMDS type 5), correspondant au déficit en ISCA1, a été répertorié chez 6 patients (Shukla et al. 2017; Torraco et al. 2018; Shukla et al. 2018).

OBJECTIFS DE TRAVAIL

Chez l'Homme, la maturation des protéines [2Fe-2S] et [4Fe-4S] mitochondriales fait appel à une machinerie protéique complexe. Elle se décompose en trois grandes étapes qui sont : i) la formation *de novo* d'un centre [2Fe-2S] sur la protéine échafaud ISCU en faisant intervenir notamment FDX1L, ii) le transfert de ce centre sur la protéine GLRX5 à l'aide d'un système chaperon et, iii) la maturation des protéines Fe-S mitochondriales qui implique notamment les protéines ISCA1, ISCA2, IBA57, BOLA3 et NFU1. Cette dernière étape consiste à l'insertion du centre [2Fe-2S] dans les protéines cibles à centre [2Fe-2S] mais aussi à la formation d'un centre [4Fe-4S] puis à son transfert sur les protéines réceptrices à centre [4Fe-4S]. Parmi ces protéines, la protéine LIAS qui porte deux centres [4Fe-4S], intervient dans la voie de lipoylation des céto-acide déshydrogénases mitochondriales avec les enzymes LIPT1 et LIPT2.

Depuis 2011, plusieurs patients présentant un déficit d'une des protéines de la voie mitochondriale de maturation des centres Fe-S ont été décrits. Entre 2012 et 2015, le service de Biochimie de l'hôpital Bicêtre a participé au diagnostic de 13 patients avec un déficit en PDHc, secondaire à un défaut de lipoylation par mutation dans un gène codant une protéine impliquée dans les étapes précoces de la biogenèse des centres Fe-S (FDX1L), dans les étapes finales de la maturation des protéines [4Fe-4S] mitochondriales (BOLA3, IBA57, ISCA2, NFU1) ou dans la voie de lipoylation (LIPT1, LIPT2). Au cours de mon travail de thèse, un nouveau patient présentant un déficit en ISCA1 a été diagnostiqué dans le service de biochimie de l'hôpital Bicêtre. Ce déficit n'était pas décrit dans la littérature lorsque j'ai commencé à m'y intéresser. L'étude de ce patient a été inclus dans ce travail.

Les objectifs de ce travail de thèse sont d'étudier les conséquences d'un déficit en acide lipoïque à l'échelle de la biochimie et de la biologie cellulaire dans les fibroblastes de 14 patients présentant un déficit en LIPT1, LIPT2, FDX1L, IBA57, ISCA1, ISCA2, BOLA3 et NFU1 pour améliorer le diagnostic de ces pathologies rares et sévères pour la plupart d'entre elles. Le déficit en acide lipoïque est commun

à toutes ces pathologies. De plus, l'acide lipoïque, de par ses importantes capacités antioxydantes, est un acteur de l'homéostasie rédox. Je me suis donc intéressée à l'effet d'un apport exogène d'acide lipoïque, dans les fibroblastes de patients, sur l'activité des protéines mitochondriales affectées dans ces pathologies ainsi que sur le niveau de stress oxydatif, potentiellement modifié.

Le second objectif de cette étude est de compléter les connaissances des mécanismes moléculaires impliquant les protéines IBA57, ISCA1, ISCA2, BOLA3 et NFU1. Pour cela, les profils d'expression des protéines NFU1, IBA57, ISCA1 et ISCA2 ont été étudiés chez plusieurs patients, déficitaires ou non en ces protéines. De plus, d'éventuels phénomènes de compensation entre protéines ou de déstabilisation de ces protéines, qui seraient signes d'interactions entre elles, ont été également recherchés.

Ce travail de thèse a été effectué en collaboration entre deux unités localisées sur deux sites différents : le service de Biochimie de l'hôpital Bicêtre (Hôpitaux Universitaires Paris-Sud, Le Kremlin-Bicêtre) et l'équipe de recherche « Signalisation rédox et fonctions des protéines Fe-S » de l'Institut de Chimie des Substances Naturelles (CNRS UPR2301, Gif-sur-Yvette).

CHAPITRE 2 :

MATERIELS ET METHODES

1 Produits

Les anticorps primaires dirigés contre GRIM19 (ab10240), NDUFS5 (ab188510), PRX2-Cys (ab16765), PRX-SO₃ (ab16830), SDHA (ab14715), SDHB (ab14714), UQCRC2 (ab14745), la protéine Rieske (ab14746) et l'acide lipoïque (ab58724) proviennent de Abcam (Cambridge, Royaume-Uni). L'anticorps dirigé contre la sous-unité E2 du complexe PDH (sc-271352) est fourni par Santa Cruz Biotechnology (Dallas, Tex, USA). L'anticorps dirigé contre la prohibitine (NBP2-37563) est fourni par Novus Biologicals (Littleton, Co, USA). Les anticorps dirigés contre NFU1, IBA57, ferrochélatase, et mt-aconitase ont été gracieusement donnés respectivement par T. Rouault, NICHD, NIH, Bethesda, Md, USA ; R. Lill, Marburg, Allemagne ; H. Puccio, Strasbourg, France ; R. B. Franklin, University of Maryland, Baltimore, Md, USA. Les anticorps anti-LIAS (PA5-22387), anti-ISCA1 (PA5-60121) et anti-ISCA2 (PA5-22387) sont produits par ThermoFisher Scientific (Rockford, IL, USA). Les anticorps secondaires dirigés contre les immunoglobulines de lapin (NA934V) et de souris (A4416) couplés à une peroxydase sont fournis par Sigma Aldrich (St Louis, Mo, USA). Pour les immunoblots, les anticorps secondaires fluorescents couplés au IRDye® 800 dirigés contre les immunoglobulines de lapin et de souris proviennent de chez LI-COR (Lincoln, NE, USA). Pour l'immunofluorescence, l'anticorps secondaire dirigé contre les immunoglobulines de lapin couplé à la fluorescence (A32723) provient de Life Technologies (Carlsbad, CA, USA).

Le milieu de culture HAM F10 (modifié avec 12 mg/L de rouge de phénol et 50 mg/l d'uridine) et le tampon Phosphate Buffered Saline (PBS) 1X proviennent de Eurobio (Les Ulis, France). Le sérum de veau fœtal, la glutamine, la trypsine et les antibiotiques (pénicilline et streptomycine 100X) proviennent de Life Technologies (Carlsbad, CA, USA). La puromycine est fournie par Invivogen (San Diego, CA, USA). L'acide lipoïque (T1395) et le polybrène sont fournis par Sigma Aldrich (St Louis, Mo, USA). Le peroxyde d'hydrogène stabilisé à 30% provient de Cooper (Melun, France).

Le réactif MitoTracker Red CMXRos (M7512) et le Hoechst (H3570) sont fournis par Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Le Citifluor provient de Biovalley (Nanterre,

France). Le paraformaldéhyde (PFA) à 16% provient de Electron Microscopy sciences (Hatfield, PA, USA). Le NH_4Cl vient de Merck (Darmstadt, Allemagne). Le Tween 20 est fourni par Sigma Aldrich (St Louis, Mo, USA).

L'inhibiteur de protéases Complete Protease Inhibitor Cocktail est fourni par Roche (Mannheim, Allemagne). Les réactifs utilisés pour la préparation de tampons (Tris, NaCl, NaF, β -glycérophosphate, éthylène-diamine tétraacétate (EDTA), triton-X100, saccharose, KCl, éthylène-bis(oxyéthylènenitrilo)tetraacétate (EGTA), l'albumine, le Percoll[®], la digitonine, le β -mercaptoethanol, l'acide caproïque, Bis-Tris, le laurylmaltoside, le sodium-dodécylsulfate (SDS), la tricine, la glycine proviennent de Sigma Aldrich (St Louis, Mo, USA). Le bleu de Coomassie provient de Réactifs RAL (Martillac, France). Le réactif de Bradford et la solution de Laemmli (4X) proviennent de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). Les gels d'électrophorèse des immunoblots ou de BN-PAGE, le 4X Sample diluant Native Page, le marqueur de poids moléculaire (BenchMark prestained protein ladder), les tampons NuPAGE[™] MOPS SDS Running Buffer et Novex[™] Tris-Glycine Transfer Buffer sont fournis par Invitrogen (Carlsbad, CA, USA). Le méthanol et l'acide acétique proviennent de Merck (Darmstadt, Allemagne). La membrane de nitrocellulose (Hybond-ECL) et le réactif de révélation de chimiluminescence (ECL) viennent d'Amersham (Piscataway, NJ, USA).

Les réactifs utilisés pour la mesure d'activités enzymatiques et le dosage du glutathion (NADH, NAD^+ , KCN, décylubiquinone, roténone, succinate, dichlorophénylindophénol, KH_2PO_4 , Na_2EDTA , antimycine, malonate, cytochrome C, antimycine, hydrosulfite de sodium, cis-aconitate, dithiotréitol, CaCl_2 , MgCl_2 , alphacétoglutarate, thiamine pyrophosphate, coenzyme A (CoA-SH), acétyl-CoA, oxalo-acétate, 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB), N-acétyl-cystéine (NAC), glutathions réduit et oxydé, acide métaphosphorique) proviennent de Sigma Aldrich (St Louis, Mo, USA). L'acide orthophosphorique est fourni par Merck (Darmstadt, Allemagne). Le kit TBARs Assay kit est fourni par Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA).

2 Culture et traitements de cellules

2.1 Origine des cellules

Les fibroblastes et les myoblastes sont issus de la culture primaire de biopsies de peau et de muscle des patients. Ces prélèvements ont été effectués après consentement du représentant légal pour la cryoconservation des cellules et pour leur utilisation ultérieure pour des études complémentaires scientifiques.

2.2 Culture des cellules

Les cellules sont cultivées à 37°C en atmosphère humide avec 5% de CO₂ dans un milieu de HAM F10 supplémenté avec 100 UI/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine et 1% de glutamine. Ce milieu sera appelé par la suite milieu de culture. Les fibroblastes sont cultivés avec le milieu de culture supplémenté avec 12% de sérum de veau fœtal, nourris deux fois par semaine et repiqués environ une fois par semaine dans des flasques de 25 cm² ou 75 cm² appelées T25 ou T75 respectivement. Les myoblastes sont cultivés avec le milieu de culture supplémenté avec 20% de sérum de veau fœtal, nourris 3 fois par semaine et repiqués une à deux fois par semaine en T75. Les cellules arrivées à confluence sont lavées au PBS et trypsinées. Elles sont ensuite soit divisées pour la suite de la culture, soit utilisées extemporanément (pour la mesure de l'activité de la mt-aconitase ou l'extraction protéique en vue du dosage du GSH), soit reprises dans du PBS, centrifugées à 1700 tr/min à 20°C pendant 7 min, lavées au PBS, recentrifugées en éliminant tout le PBS puis conservées à -80°C (culot) jusqu'à leur utilisation pour la mesure d'autres activités enzymatiques (complexes de la CRM, KGDHc, citrate synthase) ou pour extraction protéique (pour immunoblot, BN-PAGE, dosage malondialdéhyde).

2.3 Traitements des cellules

Pour les expériences de supplémentation en acide lipoïque (LA), les cellules sont traitées par le LA pendant minimum trois semaines avant leur utilisation. Une solution de LA à 0,8 g/L est préparée dans de l'éthanol, passée sur filtre 0,22 µm et conservée à +4°C pendant 7 jours (protocole recommandé par Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA). Deux fois par semaine, les cellules sont nourries ou trypsinées,

et un volume fixe de solution de LA est ajouté au milieu pour atteindre une concentration finale en acide lipoïque de 2 mg/L ou 20 mg/L. En parallèle, les cellules contrôles sont incubées avec le même volume d'éthanol.

Pour l'étude du stress oxydatif, les cellules traitées par H₂O₂ sont, dans un premier temps, lavées au PBS puis mises en contact pendant 20 minutes à température ambiante avec une solution d'H₂O₂ à 100 µM. Les cellules sont ensuite trypsinées, rincées au PBS, centrifugées comme précédemment puis le culot obtenu est conservé à -80°C jusqu'à utilisation.

2.4 Immortalisation des cellules

Le principe de cette technique repose sur l'intégration, par infection rétrovirale, du gène de la télomérase humaine (*hTERT*) et du gène de la résistance à la puromycine. La télomérase active l'élongation des télomères à chaque division cellulaire et maintient les fibroblastes en état de prolifération au-delà de leur durée de vie habituelle (20 à 30 divisions pour les fibroblastes). Il s'agit d'une modification génétique cellulaire qui requiert un agrément de l'agence de la biomédecine. Les expérimentations d'immortalisation et de sélection ont été effectuées au sein de l'unité de Marc Lombès, directeur de l'unité INSERM U-1185, UMS-32 Institut Biomédical de Bicêtre I2B, Faculté de Médecine Paris Sud, en laboratoire de niveau de sécurité L2. Pour être immortalisées, les cellules humaines sont mises en culture avec le rétrovirus déficient recombinant produit dans le surnageant de culture de cellules PA317 dérivées de fibroblastes de souris. La lignée PA317 a été initiée par Vincent Mouly (Institut de myologie, UMRS 974, Université Pierre et Marie Curie, Paris) et est utilisée avec son accord.

Après 48 h de culture des cellules PA317 en milieu de culture supplémenté avec 12% de sérum de veau fœtal à 37°C, le surnageant de culture contenant les particules virales est récupéré après passage sur filtre de 0,22 µm. Une solution de polybrène y est ajoutée à une concentration finale de 4 µg/mL pour favoriser l'interaction des virus avec la membrane des cellules à infecter. Les fibroblastes de 4 sujets (patients P4 (BOLA3) et P8 (NFU1) et de 2 témoins pour la 1^{ère} série d'immortalisation, et les fibroblastes des patients P10 (IBA57) et P12 (ISCA2) et de 2 autres témoins pour la 2^{ème} série d'immortalisation) sont cultivés avec ce surnageant

de culture infectant, 2 fois/jour, pendant 3 jours. 48 heures après la dernière infection, les fibroblastes sont divisés par trypsination puis sélectionnés par addition de puromycine à 1 µg/mL dans le milieu de culture supplémenté par 12% de SVF. Pendant 8 jours, les fibroblastes sont cultivés à 37°C dans ces conditions, nourris toutes les 48h. Après cette période, seuls les fibroblastes ayant intégré le virus, et donc le gène de la télomérase, survivent et la culture est poursuivie en laboratoire de culture cellulaire standard, hors du L2.

Les fibroblastes immortalisés des 4 patients sont analysés par biologie moléculaire pour vérifier que les anomalies moléculaires qui les caractérisent sont toujours présentes après immortalisation. L'ADN total est extrait des fibroblastes immortalisés à partir d'un culot cellulaire d'environ 2 millions de cellules par le kit EZ1 DNA Tissue Kit (QIAGEN, Hilden, Allemagne) sur l'automate EZ1 (QIAGEN, Hilden, Allemagne). L'amplification de la zone d'intérêt du gène est faite par PCR à partir de l'ADN de chaque échantillon, suivie du séquençage par la méthode de Sanger selon un protocole standard avec des amorces spécifiques présentées ci-après (Tableau 6). Pour chaque patient le génotype a été vérifié sur les cellules immortalisées.

Patient	Gène (RefSeq)	Exon	Amorce sens	Amorce anti-sens
P4	BOLA3 (NM_212552)	Exon 2	tgtgttttggggcacttaca	ctgaccctctgtccttccaa
P8	NFU1 (NM_001002755)	Exon 7	tgagtgaatttggattttacctga	gctaggtcatgaactcttttcaa
P10	IBA57 (NM_001010867)	Exon 1 Exon 3	cactctcagtcggcctcaac ggagctggacgatgttcaat	cttgagctccaccccatc agtagggcgagcagacagat
P12	ISCA2 (NM_194279)	Exon 2	gagggggcaggtaccaagact	aaatttgaataaaaagtgcacct

Tableau 6 : Séquence des amorces utilisées pour la PCR et le séquençage des exons d'intérêt à partir de l'ADN total extrait des fibroblastes immortalisés des 4 patients P4, P8, P10 et P12.

3 Etude du réseau mitochondrial et de l'acide lipoïque par immunofluorescence dans les fibroblastes et myoblastes

3.1 Ensemencement des cellules

Les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre (Menzel, 12 mm de diamètre, ThermoScientific) disposées au fond d'une plaque 24 puits pendant 48 à 72h à 37°C dans le milieu de HAM supplémenté avec 15% de SVF. Lorsque les cellules sont en quantité suffisante mais non confluentes, le milieu de culture est éliminé. Les cellules sont incubées avec un MitoTracker pour étudier le réseau mitochondrial puis fixées et incubées avec le marqueur de noyaux. Le Mitotracker est une molécule qui pénètre passivement dans la cellule puis se concentre dans la mitochondrie active par un système dépendant du potentiel de membrane. Ce marqueur est visible au microscope à fluorescence qui possède une longueur d'onde d'excitation à 595 nm et une longueur d'onde d'émission à 613 nm.

Pour étudier le réseau mitochondrial, les cellules sont rincées 1 fois au PBS puis incubées avec une solution de MitoTracker® à 0,1 µM en concentration finale dans du milieu de HAM pendant 30 à 45 minutes à 37°C, à l'obscurité. La suite des expérimentations est réalisée à température ambiante et à l'abri de la lumière.

Pour étudier le marquage cellulaire du LA par immunofluorescence, les cellules sont fixées (après ou non incubation avec un MitoTracker), perméabilisées, incubées avec l'anticorps primaire reconnaissant le LA puis l'anticorps secondaire et enfin avec le marqueur de noyaux.

3.2 Fixation des cellules

Les cellules sont rincées au PBS puis fixées avec du paraformaldéhyde (PFA) à 4% pendant 20 min. Après élimination du PFA et un lavage au PBS, les cellules sont incubées avec une solution contenant 20 mM de NH₄Cl pendant 10 min, pour neutraliser le PFA non fixé aux cellules, puis rincées 3 fois au PBS.

3.3 Marquage cellulaire de l'acide lipoïque

Les cellules fixées sont perméabilisées avec une solution de Triton-X100 dilué à 0,3% dans le PBS pendant 10 min puis lavées 3 fois au PBS. Les cellules sont ensuite incubées avec une solution de saturation (lait écrémé 5% dans du tampon PBS-Tween à 0,1%) pendant 1h à température ambiante ou toute la nuit à +4°C. Après élimination de la solution de saturation, les cellules sont incubées toute la nuit à +4°C avec une solution contenant un anticorps dirigé contre l'acide lipoïque, dilué au 1/500^{ème} dans la solution de saturation. Après 3 rinçages avec le tampon PBS-Tween 0,1%, les cellules sont incubées pendant au moins 1h à température ambiante avec un anticorps secondaire couplé à un marqueur fluorescent et dirigé contre les immunoglobulines de lapin dilué au 1/1000^{ème} dans un tampon PBS-Tween 0,1%. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec le tampon PBS-Tween 0,1%.

3.4 Marquage des noyaux cellulaires

Les cellules sont incubées avec une solution de Hoechst à une concentration finale de 1 µg/ml dans le PBS pendant 1 min. Les cellules sont enfin rincées 3 fois avec le tampon PBS-Tween 0,1%.

1 µL de Citifluor est déposé sur une lame adaptée à l'observation microscopique. Le Citifluor permet de limiter la perte de fluorescence, c'est-à-dire l'effet quenching, au cours du temps. La lamelle contenant les cellules à sa surface est déposée dans le Citifluor, sur la lame. Chaque lamelle est ensuite scellée avec du vernis à ongle. Les cellules sont ensuite observées au microscope à fluorescence au grossissement 100X. Les images sont acquises par une caméra et traitées par le logiciel Qcapture Pro version 5.1 (Q Imaging Inc., Surrey, British Columbia, Canada).

4 Extractions protéiques

4.1 Extraits protéiques totaux (homogénats)

Les culots cellulaires provenant de 1T75 ou 2T75 de fibroblastes ou myoblastes conservés à -80°C sont décongelés dans la glace.

Pour les mesures d'activité enzymatique et la mesure polarographique, le culot cellulaire est repris dans du PBS, dans le même volume que le culot, soit environ 200 µL de PBS pour un culot de 1T75. Le dosage des protéines selon la méthode de Bradford est réalisé sur cet homogénat. Pour la mesure de l'activité du complexe II, les cellules sont plongées dans l'azote liquide pendant 15 minutes juste avant la mesure pour lyser les cellules.

Pour l'immunoblot, les cellules sont reprises dans un volume de 150 à 300 µl de tampon de lyse contenant 50 mM de Tris-HCl pH=7.5, 100 mM de NaCl, 50mM de NaF, 40 mM de béta-glycérophosphate, 5 mM d'EDTA, et 1% de Triton-X100 et l'inhibiteur de protéases au 1/1500^{ème}. Les cellules sont incubées avec le tampon de lyse pendant 20 min sur la glace puis centrifugées pendant 10 min à 10 000 tr/min à +4°C. Le surnageant est récupéré et le dosage des protéines selon la méthode de Bradford est réalisé sur ce surnageant. Ce dernier est ensuite conservé à -80°C en conditions réductrices (25% Laemmli 4X et avec 10% de béta-mercapto-éthanol) jusqu'à réalisation de l'immunoblot.

Pour le dosage du glutathion, deux T75 de fibroblastes à confluence sont nécessaires. Les cellules sont lavées au PBS, trypsinées puis les cellules sont regroupées et récupérées dans du tampon PBS, centrifugées à 1700 tr/min à 20°C pendant 7 min. Après un deuxième lavage du culot obtenu avec du tampon PBS et une centrifugation identique, le culot est conservé dans la glace. Les expérimentations suivantes sont réalisées dans la glace. Le culot est repris dans 100 µl d'eau distillée à +4°C. Un échantillon de ce lysat (20 µl environ) est conservé pour le dosage des protéines par la méthode de Bradford et le dosage de la citrate synthase. Le reste du lysat est mélangé avec 10% V/V d'une solution de NAC (servant de contrôle interne) et 10 %V/V d'une solution d'acide métaphosphorique (MPA) à 40 % (pour précipiter les protéines), puis vortexé et incubé dans la glace

pendant 5 minutes (pour la préparation de ces solutions, se référer au paragraphe 8.1). Il est ensuite centrifugé pendant 10 min, 10 000 tr/min à +4°C, filtré sur des micro-colonnes à 30 kDa par centrifugation pendant 30 min, à 10 000 tr/min à +4°C pour éliminer les protéines. Le filtrat de chaque échantillon est ensuite conservé à -80°C jusqu'au dosage du GSH.

4.2 Fractions enrichies en mitochondries

L'enrichissement en mitochondries est réalisé à partir d'un culot cellulaire provenant de 2T75 de fibroblastes ou myoblastes conservé à -80°C décongelé dans la glace ou à partir d'un culot de cellules obtenu par trypsination extemporanée d'1T75 ou 2 T75 (voir paragraphe 2.2). Les cellules sont incubées pendant 10 min dans la glace dans 0,5 à 1 ml de tampon A (20 mM de Tris, 0.25 M de saccharose, 40 mM de KCl, 2 mM d'EGTA ajusté à pH 7,2), complété avec de l'albumine à 1 mg/mL finale, 10% de Percoll et une solution de digitonine à 0.01% finale. Après une centrifugation pendant 5 min à 5000 tr/min à +4°C, le surnageant est éliminé, le culot de cellules perméabilisées à la digitonine est lavé avec 1 mL du tampon A supplémenté avec de l'albumine à 1 mg/mL finale puis centrifugé pendant 5 minutes à 5000 tr/min à +4°C. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est ensuite repris par 150 à 200 µl d'un tampon adéquat selon la technique d'utilisation de l'échantillon (Tableau 7). Après centrifugation à 10 000 tr/min pendant 10 min, le surnageant (extrait protéique) est conservé pour le dosage des protéines par la technique de Bradford. L'échantillon est ensuite conservé ou utilisé extemporanément selon la technique utilisée (Tableau 7).

Technique	Tampon de reprise du culot	Conservation de l'échantillon
Immunoblot	Tampon de lyse (voir 4.1, p.77)	Conservation à -80°C en conditions réductrices (25% Laemmli à 10% de β-mercaptoéthanol) jusqu'à réalisation de la technique.

Technique	Tampon de reprise du culot	Conservation de l'échantillon
Activités enzymatiques des complexes de la CRM, du complexe KGDHc, de la citrate synthase	Tampon A supplémenté avec de l'albumine à 1 mg/mL finale	Utilisation extemporanée avec possibilité de congélation à -80°C pendant 24 à 48h
Activité enzymatique de la mt-aconitase	Tampon Triton-X100 à 0,5% dans solution à 0,1 M de Tris-HCl pH=7,5	Utilisation extemporanée

Tableau 7 : Variations des conditions de réalisation et de conservation des fractions de cellules enrichies en mitochondries selon la technique utilisée.

Pour l'analyse par BN-PAGE, les cellules perméabilisées à la digitonine sont lavées avec le tampon A supplémenté avec de l'albumine à 1 mg/mL finale puis centrifugées à 10 000 tr/min pendant 10 min à +4°C. Le culot est repris dans 100 µl de tampon ACBT (1 mM d'acide caproïque et 75 mM de Bis-Tris) à pH=7 et 20 µl de solution de laurylmaltoside à 10% dans de l'eau distillée (solution LM). Les cellules du culot sont incubées 10 min sur la glace, puis centrifugées 30 min à 10000 tr/min à +4°C. Le surnageant est récupéré et dilué à 75% dans du tampon 4X Sample diluant Native Page® et les protéines sont dosées par la méthode de Bradford sur cet échantillon. Chaque échantillon est à nouveau dilué avec la solution B pour obtenir 45 µl d'échantillon à 1 µg/µl de protéines. La solution B contient 62,5% de tampon ACBT, 12,5% de solution LM et 25% de tampon 4X Sample diluant Native Page. Cet échantillon est congelé à -80°C jusqu'à réalisation du BN-PAGE.

4.3 Dosage des protéines avec le réactif Bradford

La concentration protéique de l'ensemble des extraits cellulaires utilisés dans ce travail est déterminée par la technique de Bradford. La mesure est réalisée en triple pour chaque échantillon. 1 à 5 µl d'échantillon est incubé 20 min à température ambiante avec 20 µl d'une solution de Triton-X100 à 0,5% dans H₂O. Ensuite, 880 µl de NaCl isotonique à 0,9% et 200 µl de réactif de Bradford sont ajoutés et la densité optique (DO) des échantillons est lue immédiatement à 595 nm. La concentration en protéines est déterminée à l'aide d'une gamme étalon d'albumine bovine comprise entre 3 et 12 µg/ml.

5 Mesure de la consommation d'O₂ par polarographie

La consommation de l'oxygène par les mitochondries de l'homogénat de fibroblastes ou myoblastes (paragraphe 4.1) est mesurée en présence de pyruvate ou de succinate. L'échantillon est mis dans des cuves thermostatées à 37°C reliées à polarographe. Le milieu réactionnel contient de l'ADP pour stimuler la respiration puis un agent protonophore (MCCP), appelé découplant, est ajouté et dissipe chimiquement le gradient de protons entraînant alors une dissociation entre oxydation et phosphorylation et une forte accélération de la consommation d'oxygène.

La consommation en O₂ en présence de pyruvate (cuve A) et d'un agent découplant est ainsi le reflet des activités enzymatiques de PDHc, des enzymes du cycle de Krebs et des complexes I, III et IV de la CRM. L'ajout de malate permet ensuite de court-circuiter le complexe PDH. La consommation d'O₂ en présence de succinate (cuve B) permet d'évaluer les activités des complexes II à IV, le complexe I étant inhibé par la roténone. Les résultats sont exprimés en nmol d'O₂ consommé/min/mg protéine.

Dans chaque cuve, l'homogénat cellulaire est mis dans un tampon contenant du 0,3 M de mannitol, 10 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂, 10 mM de KH₂PO₄, ajusté à pH= 7,4 et supplémenté avec 1 mg/ml d'albumine et 0,02 mg/mL de digitonine. Ensuite différents substrats sont ajoutés dans les cuves A et B.

Dans la cuve A, 8 mM de pyruvate (substrat du cycle de Krebs et du complexe I), 0,16 mM d'ADP (pour activer la respiration), 0,2 mM de malate (pour activer le cycle de Krebs), et 0,8 mM de NAD⁺ (cofacteur des enzymes du cycle de Krebs) sont ajoutés. Lorsque la consommation en O₂ est linéaire, 5 µM d'oligomycine et 2,4 µM de MCCP (agent découplant) sont ajoutés pour inhiber le complexe V. La pente obtenue reflète la consommation en O₂ en présence de pyruvate. Ensuite, dans la même cuve, la consommation en O₂ est mesurée après ajout de 5 mM de malate et 16 mM de glutamate (pour activer le cycle de Krebs et piéger l'oxalo-acétate en excès). La pente obtenue correspond à la consommation en O₂ en présence de malate.

Dans la cuve B, 10 mM de succinate (substrat du complexe II), 4 μ M de roténone (inhibiteur du complexe I), 0,16 mM d'ADP et 0,4 mM d'ATP (activateurs de la respiration mitochondriale) sont ajoutés dans la cuve. Lorsque la consommation en O₂ est linéaire, 5 μ M d'oligomycine et 2,4 μ M de MCCP (agent découplant) sont ajoutés pour inhiber le complexe V. La pente obtenue correspond à la consommation d'O₂ en présence de succinate.

6 Mesure des activités enzymatiques

Les activités enzymatiques sont mesurées sur un spectrophotomètre d'absorption UV-visible thermostaté à 37°C. Les concentrations des réactifs indiquées ci-après sont les concentrations finales. Les protocoles de mesure de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire, du complexe KGDHc et de la citrate synthase ont été publiés par (Rustin et al. 1994).

6.1 Complexes de la CRM

La mesure de l'activité des complexes de la CRM est réalisée sur un enrichissement de mitochondries ou un homogénat de fibroblastes ou de myoblastes (voir paragraphe 4.2, p.78). Pour chaque réaction enzymatique, l'absorbance est mesurée à la longueur d'onde cible et à une longueur d'onde 20 nm inférieure à celle-ci afin de limiter le bruit de fond et d'augmenter la sensibilité du test.

6.1.1 Complexe I

La mesure du complexe I est réalisée uniquement sur un enrichissement de mitochondries. L'activité du complexe I dans l'échantillon se mesure par la vitesse d'oxydation du NADH qui absorbe à 340 nm en présence de 800 μ L d'eau distillée, 15 μ L d'échantillon, d'un tampon Tris 50 mM ajusté à pH 8,0 supplémenté avec du KCN à 0,32 mM, NADH à 0,2 mM et de quinone oxydée (décyubiquinone) à 0,04 mM. Après 10 min d'incubation, une solution de roténone à 4 μ M est ajoutée pour inhiber le complexe I, pendant 5 minutes. L'activité est calculée selon la différence

entre la pente de la première réaction (réaction totale) et la pente de la deuxième réaction (réaction non spécifique).

6.1.2 Complexe II

Le complexe II transfère les électrons du succinate vers l'ubiquinone (décyubiquinone). *In vitro*, l'ubiquinone peut transférer des électrons au dichlorophénylindophérol (DCIP) qui absorbe à 600 nm. Le DCIP est donc le substrat de la réaction utilisée pour mesurer l'activité du complexe II. La réaction est réalisée dans 1 mL de volume total avec 4 μ L d'échantillon et du succinate à 5 mM dans un tampon B (contenant KH_2PO_4 10 mM et Na_2EDTA 2 mM ajusté à pH 7,8 et supplémenté avec 1 mg/ml d'albumine), de la roténone 4 μ M pour inhiber le complexe I, de l'antimycine 2 μ M pour inhiber le complexe III et du KCN 0,32 mM pour inhiber le complexe IV. Le DCIP est ajouté à 80 μ M et après 4 min d'incubation, la quinone oxydée (décyubiquinone) à 80 μ M est apportée dans le milieu réactionnel. Après 7 min d'incubation, la réaction enzymatique est stoppée par du malonate à 5 mM (inhibiteur du complexe II). L'activité est calculée par la différence entre la pente de la réaction sans malonate (réaction totale) et la pente de la réaction après ajout du malonate (réaction non spécifique).

6.1.3 Complexe III

Le cytochrome c réduit est le produit de réaction du complexe III par transfert d'électrons depuis l'ubiquinone réduite (décyubiquinol) au cytochrome c oxydé. Le cytochrome c réduit absorbe à 550 nm. L'activité du complexe III est mesurée dans 1 mL de volume total avec 4 μ L d'échantillon par la vitesse d'apparition du produit à 550 nm en présence de tampon B (voir paragraphe 6.1.2), de laurylmaltoside 0,625 mM, de KCN 0,32 mM, de cytochrome c oxydé 40 μ M, de décyubiquinol 60 μ M, puis de l'antimycine 5 μ M (inhibiteur du complexe III). L'activité mesurée en présence d'antimycine est soustraite de l'activité totale mesurée pour obtenir l'activité spécifique du complexe III.

6.1.4 *Complexe IV*

Le complexe IV oxyde le cytochrome c réduit avec de l'O₂. Le cytochrome c réduit, substrat de la réaction qui absorbe à 550 nm, est obtenu en mélangeant de l'hydrosulfite de sodium et du cytochrome c oxydé. L'activité du complexe IV dans l'échantillon est mesurée dans un volume total de 1 mL en suivant la diminution de l'absorbance du substrat à 550 nm. 4 µL d'échantillon sont incubés dans un tampon (contenant KH₂PO₄ 10 mM et saccharose 0,3 M) ajusté à pH 6,8 supplémenté avec 1 mg/mL d'albumine, du laurylmaltoside 2,5 mM et du cytochrome c réduit à 10 µM, pendant 5 minutes. L'activité mesurée du complexe IV correspond à la vitesse de disparition du cytochrome c réduit.

6.2 Enzymes du cycle de Krebs

6.2.1 *Aconitase mitochondriale*

L'activité enzymatique de l'aconitase mitochondriale est réalisée sur les fractions enrichies en mitochondries de fibroblastes (voir paragraphe 4.2, p.78). Le dosage s'effectue dans une cuve en quartz en présence de 30 µg de protéines, 300 µmoles de cis-aconitate dans un tampon Tris-HCl 0,1 M à pH 7,5, dépourvu d'oxygène. Ce tampon a été dégazé immédiatement avant la réaction par bullage d'un gaz neutre (azote ou argon). La vitesse de diminution de l'absorption à 240 nm du cis-aconitate, rapportée à la quantité de protéines et au volume total, correspond à l'activité de l'aconitase mitochondriale.

6.2.2 *Complexe KGDHc*

La réaction enzymatique du complexe KGDHc conduit à la formation de NADH et de succinyl-CoA à partir de l'alpha-cétoglutarate et du CoA-SH. Le NADH absorbe à 340 nm et sa vitesse d'apparition correspond à l'activité enzymatique du complexe KGDHc dans les conditions suivantes. Dans un volume total de 1 mL, 10 µL d'échantillon sont incubés pendant 20 min dans le tampon B (supplémenté par Triton-X100 à 0,1%, dithiotréitol 2 mM, EDTA 2,5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 2 mM), avec du NAD⁺ à 1 mM, de l'alpha-cétoglutarate à 2 mM, du thiamine pyrophosphate à 0,1 mM, et du CoA-SH à 0,25 mM. La vitesse d'apparition du NADH rapportée à la

concentration de protéines dans l'échantillon correspond à l'activité du complexe KGDHc.

6.2.3 Citrate synthase

La citrate synthase forme du citrate et du CoA-SH à partir de l'oxaloacétate et de l'acétylCoA. Le CoA-SH formé peut réagir avec le DTNB pour donner du TNB qui absorbe spécifiquement à 412 nm. L'activité de la citrate synthase est donc mesurée en suivant l'augmentation de l'absorbance à 412 nm dans les conditions expérimentales suivantes. Dans un volume total de 1 mL, 4 µL d'échantillon sont incubés dans du tampon B supplémenté par du Triton-X100 à 0,1%, du DTNB à 0,5 mM, de l'acétylCoA à 0,2 mM et de l'oxaloacétate à 9 mM. La vitesse d'apparition du TNB rapportée à la concentration protéique de l'échantillon correspond à l'activité de la citrate synthase.

7 Immunoblot et BN-PAGE

7.1 Immunoblot

Trente à quarante microgrammes de protéines provenant d'homogénat ou de fractions enrichies en mitochondries de fibroblastes ou de myoblastes (voir paragraphe 4, p.77) sont séparées par migration électrophorétique en conditions dénaturantes. Sur chaque gel, 8 µl de marqueur de poids moléculaire, sont déposés dans un puits. Le gel d'électrophorèse est un gel gradient de 4 à 12 % Bis-Tris ou un gel de 16% tricine pour la détection des protéines ISCA1 et ISCA2. La migration s'effectue dans un tampon NuPAGE™ MOPS SDS Running Buffer à 150 V pendant 75 à 90 min pour un gel 4-12% et à 115V pendant 110 à 120 minutes pour un gel à 16%. Les échantillons sont transférés sur une membrane de nitrocellulose, dans le tampon de transfert contenant 25 mM de Tris, 192 mM de glycine ou Novex™ Tris-Glycine Transfer Buffer auquel sont ajoutés 70 µM de SDS et 10 % de méthanol. Le transfert est effectué à 80 V pendant 2 h, à +4°C. La membrane est incubée pendant 15 min dans l'acide acétique 8% V/V puis lavée pendant 15 min dans du tampon PBS –Tween 0,05%. Elle est ensuite incubée une heure à température ambiante

dans la solution de blocage (PBS-Tween contenant 5% de lait écrémé), puis durant la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire dilué dans la solution de blocage ou du PBS-Tween 0,05% (Tableau 8). Après élimination de la solution d'anticorps primaire, plusieurs lavages à température ambiante dans le tampon PBS-Tween 0,05%, la membrane est incubée avec un anticorps secondaire (couplé à la peroxydase ou à un marqueur fluorescent IRDye® 800), dilué au 1/1000^{ème} dans le tampon PBS-Tween 0,05% (Tableau 8). Après plusieurs lavages, la bande immunomarquée correspondant à la protéine d'intérêt est révélée par chimioluminescence à l'aide du réactif ECL et l'appareil GBox (Ozyme, Saint-Quentin-en-Yvelines, France) si utilisation d'un anticorps couplé à la peroxydase ou par détection de fluorescence sur l'appareil Odyssey Imaging system, LiCOR Biosciences (Lincoln, NE, USA), si utilisation d'un anticorps couplé fluorescent.

Protéine cible de l'anticorps primaire	Dilution de l'anticorps primaire	Tampon de dilution de l'anticorps primaire	Espèce de production de l'anticorps primaire
PDH-E2	1/800	Lait écrémé 5% PBS-Tween	Souris
Acide-lipoïque	1/1000	Lait écrémé 5% PBS-Tween	Lapin
LIAS	1/1000	PBS-Tween	Lapin
SDHA	1/2000	PBS-Tween	Souris
SDHB	1/800	PBS-Tween	Souris
Protéine Rieske	1/1000	PBS-Tween	Souris
ISCA1	1/500	Lait écrémé 5% PBS-Tween	Lapin
ISCA2	1/300	Lait écrémé 5% PBS-Tween	Lapin
IBA57	1/200	PBS-Tween	Lapin
NFU1	1/5000	PBS-Tween	Lapin
Ferrochélatase	1/2000	PBS-Tween	Lapin
Mt-aconitase	1/500	Lait écrémé 5% PBS-Tween	Lapin
IRP1	1/2000	PBS-Tween	Lapin
Prohibitine	1/2000	PBS-Tween	Lapin
GAPDH	1/5000	PBS-Tween	Lapin
PRX-SO3H	1/3000	PBS-Tween	Lapin

Protéine cible de l'anticorps primaire	Dilution de l'anticorps primaire	Tampon de dilution de l'anticorps primaire	Espèce de production de l'anticorps primaire
PRX-Cys2	1/3000	PBS-Tween	Lapin
NDUFS5	1/1000	Lait écrémé 5% PBS-Tween	Lapin

Tableau 8 : Dilution et espèce de production des anticorps primaires utilisés pour la détection des protéines par immunoblot.

7.2 BN-PAGE

Six à quinze microgrammes d'échantillons de fibroblastes préparés pour le BN-PAGE (voir paragraphe 4.2, p.78) sont déposés sur un gel Native PAGE 4-16% Bis-Tris Gel. A l'anode, le tampon de migration est un tampon Bis-Tris 10 mM à pH 7. A la cathode, le tampon de migration contient de la tricine 10 mM, du Bis-Tris 3 mM, 0,02% de bleu de Coomassie, ajusté à pH 7. L'électrophorèse est réalisée dans ces conditions pendant 30 min à 80 V puis pendant 2 h à 100 V. A la fin de cette étape, le tampon de migration de la cathode est alors remplacé par un tampon contenant de 10 mM de tricine, et 3 mM de Bis-Tris ajusté à pH 7 et l'électrophorèse est poursuivie pendant 2 h à 120 V. Les échantillons sont ensuite transférés sur une membrane de nitrocellulose avec le tampon de transfert contenant 25 mM de Tris, 192 mM de glycine et 70 µM de SDS et 10 % de méthanol. Le transfert est effectué à 80 V pendant 2 h à +4°C. La membrane est incubée pendant 15 minutes dans l'acide acétique 8% V/V puis lavée pendant 15 minutes dans du tampon PBS-Tween 0,05%. Elle est ensuite incubée une heure à température ambiante dans le tampon de blocage PBS-Tween 0,05% contenant 2,5% de lait écrémé, puis durant la nuit à 4°C avec l'anticorps spécifique dirigé contre la protéine d'intérêt dilué dans la solution de blocage (Tableau 9). Après 3 lavages à température ambiante dans le tampon PBS-Tween 0,05%, la membrane est incubée pendant 1 h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (dirigé contre les immunoglobulines de souris et couplé à la peroxydase) dilué au 1/1000^{ème} dans la solution de blocage. Après 3 lavages, la bande immunomarquée correspondant à la protéine d'intérêt est révélée par chimioluminescence à l'aide du réactif ECL. La membrane est ensuite de nouveau incubée avec un autre anticorps primaire dirigé contre une autre protéine

d'intérêt dilué dans la solution de blocage durant la nuit à +4°C. Après 3 lavages au PBS-Tween 0.05%, la membrane est réincubée avec l'anticorps secondaire anti-souris couplé à la peroxydase pendant 1h à température ambiante. Les lavages et la révélation sont faits comme ci-dessus.

Anticorps primaires	Protéine cible	Dilution dans la solution de blocage
Anti-GRIM19	GRIM-19 (complexe I de la CRM)	1/1200
Anti-SDHA	SDHA (complexe II de la CRM)	1/8000
Anti-UQCRC2	UQCRC2 (complexe III de la CRM)	1/3000
Anti-COX1	COX1 (complexe IV de la CRM)	1/1200

Tableau 9 : Anticorps utilisés pour la détection des complexes de la CRM par Blue-Native PAGE

8 Dosage de métabolites impliqués dans l'homéostasie rédox

8.1 Dosage du GSH

Le glutathion réduit (GSH) et oxydé (GSSG) sont dosés simultanément par coulométrie après séparation par chromatographie liquide haute performance (HPLC). La phase mobile utilisée pour l'HPLC est un tampon filtré contenant 10 mM de NaH₂PO₄ ajusté à pH=2,7 par de l'acide orthophosphorique à 85%, avec 15% de méthanol. La concentration du GSH dans l'échantillon est calculée à partir d'une gamme étalon allant de 0 à 25 µM de GSH et de 0 à 18,5 µM de GSSG. L'étalon interne est la N-acétyl-cystéine (NAC) à 173 µM en concentration finale. La NAC est ajoutée à chaque point de la gamme étalon et dans chaque échantillon en même quantité (voir paragraphe 4.1 pour la préparation des échantillons). Les contrôles de qualité internes de GSH à deux niveaux sont fournis par Chromsystems (La Haye, Pays-Bas) et sont dosés à chaque série pour valider l'analyse des échantillons. La colonne utilisée est une colonne Uptisphère C18 avec un débit de phase mobile à 1 ml/min. La solution de rinçage utilisée entre chaque échantillon est composée à 50%

de méthanol et 50% d'H₂O. La détection coulométrique est effectuée à 0,87 V pour un ampérage d'environ 6 µA.

8.2 Dosage du malondialdéhyde

Le dosage du malondialdéhyde (MDA) est effectué dans les culots de fibroblastes de 2T75 qui avaient été cultivés en présence d'acide lipoïque à 2 mg/L ou d'éthanol, véhicule du LA, avant la réalisation des culots cellulaires conservés à -80°C. Les culots sont décongelés dans la glace, repris dans 150 µL de PBS, et lysés par sonication en mode impulsif (3 impulsions de 2 s) dans la glace. Les protéines sont dosées par la méthode de Bradford dans chaque lysat (voir paragraphe 4.3) puis les expérimentations du dosage du MDA sont réalisées selon les recommandations du kit TBARs Assay Kit utilisé. Le principe repose sur la réaction à haute température de l'acide thiobarbiturique (TBA) avec le MDA, en milieu acide, pour former un composé MDA-TBA qui absorbe à la longueur d'onde de 530 nm. Les échantillons sont traités dans les mêmes conditions que les standards servant à la gamme étalon du MDA fournis dans le kit. La quantité de MDA dans l'échantillon est obtenue à partir de cette gamme étalon et rapportée à la quantité de protéines dans l'échantillon.

CHAPITRE 3 :

RESULTATS ET DISCUSSION

1 Etude d'anomalies de protéines mitochondriales sur les fibroblastes de patients déficitaires en FDX1L, IBA57, ISCA2, BOLA3, NFU1, LIPT1 et LIPT2

Cette première étude a pour objectif d'effectuer une caractérisation biochimique sur fibroblastes de patients présentant des mutations identifiées dans différents gènes codant des protéines impliquées dans la biogenèse des centres Fe-S (FDX1L, ISCA2, IBA57, NFU1, BOLA3) ou dans la synthèse de l'acide lipoïque (LIPT1, LIPT2). Ces anomalies entraînent un tableau clinique sévère avec encéphalopathie et dégradation rapide de l'état clinique suivie d'un décès précoce de la plupart des patients. Les pathologies causées par une anomalie dans les protéines impliquées dans la maturation des protéines Fe-S (BOLA3, NFU1, ISCA2, IBA57) sont décrites comme des syndromes de dysfonctionnement mitochondrial multiple (MMDS, voir Introduction bibliographique, p.59).

Ces patients sont des sujets pour lesquels une diminution de l'activité du complexe PDHc dans les fibroblastes avait été mise en évidence dans le service de biochimie de l'hôpital Bicêtre mais sans anomalie retrouvée dans les différents gènes codant les sous-unités de ce complexe. Le diagnostic n'étant pas abouti, l'étude des complexes de la CRM a été réalisée et a montré des dysfonctionnements de cette dernière associés au déficit en PDHc. Lorsque les premiers cas de déficits en NFU1, BOLA3, LIAS ont été décrits dans la littérature (Mayr et al. 2011; Cameron et al. 2011), l'analyse moléculaire des différents gènes, codant les protéines impliquées dans la biogenèse des centres Fe-S, a été réalisée dans le service de biochimie de l'hôpital Bicêtre pour les patients en question. Parmi les patients analysés, des anomalies ont été identifiées dans les gènes *NFU1*, *BOLA3*, *IBA57* et *ISCA2* pour dix d'entre eux. Pour 3 autres patients (patients LIPT1, LIPT2 et FDX1L de notre étude), l'analyse moléculaire par exome réalisée dans un laboratoire extérieur a permis de les diagnostiquer. Les protéines LIAS, LIPT1 et LIPT2 sont les 3 enzymes de la synthèse de l'acide lipoïque, cofacteur du complexe PDHc (Cronan et al. 2005; Baker et al. 2014; Tort et al. 2014; Soreze et al. 2013). La présence de deux centres [4Fe-4S] dans la LIAS implique que la synthèse de l'acide lipoïque et la voie de biogenèse

des centres Fe-S sont liées. En effet, les protéines FDX1L, IBA57, ISCA2, BOLA3 et NFU1 interviennent, quant à elles, dans la synthèse mitochondriale des centres Fe-S et donc dans la maturation de la protéine LIAS (Sheftel et al. 2010). Au début de mon travail, les données concernant la fonction de ces protéines dans la maturation des protéines Fe-S étaient limitées et l'impact de leur déficit sur la maturation des protéines Fe-S mitochondriales n'était pas clairement établi.

J'ai donc entrepris une analyse biochimique sur les fibroblastes de 10 patients avec des déficits en NFU1 (n=4), BOLA3 (n=2), ISCA2 (n=2), IBA57 (n=2), d'un patient présentant un déficit en FDX1L, et de deux patients ayant un déficit dans la voie de synthèse de l'acide lipoïque (LIPT1 et LIPT2). Dans ce manuscrit, les différents patients seront régulièrement nommés par la lettre P et un chiffre. Le gène muté pour chaque patient est présenté dans le Tableau 10.

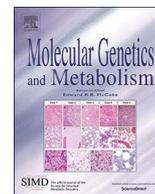
Patient	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13
Gène muté	<i>LIPT1</i>	<i>LIPT2</i>	<i>BOLA3</i>	<i>BOLA3</i>	<i>NFU1</i>	<i>NFU1</i>	<i>NFU1</i>	<i>NFU1</i>	<i>IBA57</i>	<i>IBA57</i>	<i>ISCA2</i>	<i>ISCA2</i>	<i>FDX1L</i>

Tableau 10 : Gène muté responsable de la pathologie des 13 patients inclus dans ce manuscrit.

Les anomalies génétiques sont décrites dans l'article ci-dessous.

L'objectif de ce travail est de mieux comprendre la physiopathologie de ces maladies rares en étudiant les conséquences d'un déficit en acide lipoïque dans les fibroblastes de ces patients, à l'échelle de la biochimie et de la biologie cellulaire. Ces patients étant suivis par différents pédiatres, ces derniers ont apporté les renseignements cliniques et ont donné leur accord pour la réalisation de ce travail (Pr de Lonlay, Pr Boespflug-Tanguy, Dr Héron).

1.1 Article : "Impact of mutations within the [Fe-S] cluster or the lipoic acid biosynthesis pathways on mitochondrial protein expression profiles in fibroblasts from patients"



Impact of mutations within the [Fe-S] cluster or the lipoic acid biosynthesis pathways on mitochondrial protein expression profiles in fibroblasts from patients

E. Lebigot^{a,b}, P. Gaignard^a, I. Dorboz^c, A. Slama^a, M. Rio^d, P. de Lonlay^d, B. Héron^e, F. Sabourdy^f, O. Boespflug-Tanguy^{c,g}, A. Cardoso^a, F. Habarou^h, C. Ottolenghi^h, P. Théron^a, C. Bouton^b, M.P. Golinelli-Cohen^b, A. Boutron^{a,*}

^a Biochemistry Department, Hôpital de Bicêtre, Hôpitaux universitaires Paris-Sud, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 94270 Le Kremlin Bicêtre, France

^b Institut de Chimie des Substances Naturelles (ICSN), CNRS UPR 2301, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette cedex, France

^c Inserm U1141, Paris Diderot University, Sorbonne Paris Cité, DHU PROTECT, Hôpital Robert Debré, Paris, France

^d Reference Center of Inherited Metabolic Diseases, Hôpital Necker Enfants Malades, Institut Imagine, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, Université Paris-Descartes, 75015 Paris, France

^e Neuropediatrics Department, Hôpital Trousseau, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 75012 Paris, GCR Concer-LD Sorbonne Universités UPMC, Univ 06, Paris, France

^f Metabolic Biochemistry Department, Hôpital des Enfants, 31059 Toulouse cedex, France

^g Neuropediatrics Department, Hôpital Robert Debré, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 75019 Paris, France

^h Metabolic Biochemistry Department, Hôpital Necker Enfants Malades, Assistance Publique – Hôpitaux de Paris, 75015 Paris, France

ABSTRACT

Lipoic acid (LA) is the cofactor of the E2 subunit of mitochondrial ketoacid dehydrogenases and plays a major role in oxidative decarboxylation. *De novo* LA biosynthesis is dependent on LIAS activity together with LIPT1 and LIPT2. LIAS is an iron-sulfur (Fe-S) cluster-containing mitochondrial protein, like mitochondrial aconitase (mt-aco) and some subunits of respiratory chain (RC) complexes I, II and III. All of them harbor at least one [Fe-S] cluster and their activity is dependent on the mitochondrial [Fe-S] cluster (ISC) assembly machinery. Disorders in the ISC machinery affect numerous Fe-S proteins and lead to a heterogeneous group of diseases with a wide variety of clinical symptoms and combined enzymatic defects. Here, we present the biochemical profiles of several key mitochondrial [Fe-S]-containing proteins in fibroblasts from 13 patients carrying mutations in genes encoding proteins involved in either the lipoic acid (*LIPT1* and *LIPT2*) or mitochondrial ISC biogenesis (*FDX1L*, *ISCA2*, *IBA57*, *NFU1*, *BOLA3*) pathway. Ten of them are new patients described for the first time. We confirm that the fibroblast is a good cellular model to study these deficiencies, except for patients presenting mutations in *FDX1L* and a muscular clinical phenotype. We find that oxidative phosphorylation can be affected by LA defects in *LIPT1* and *LIPT2* patients due to excessive oxidative stress or to another mechanism connecting LA and respiratory chain activity. We confirm that *NFU1*, *BOLA3*, *ISCA2* and *IBA57* operate in the maturation of [4Fe-4S] clusters and not in [2Fe-2S] protein maturation. Our work suggests a functional difference between *IBA57* and other proteins involved in maturation of [Fe-S] proteins. *IBA57* seems to require *BOLA3*, *NFU1* and *ISCA2* for its stability and *NFU1* requires *BOLA3*. Finally, our study establishes different biochemical profiles for patients according to their mutated protein.

1. Introduction

Lipoic acid (LA) is an important antioxidant used in human therapeutics [1,2]. It is also found as a covalent cofactor of the H subunit of the glycine cleavage system (GCS) and of E2 subunits of mitochondrial ketoacid dehydrogenase complexes, namely pyruvate dehydrogenase

(PDHc), α -ketoglutarate dehydrogenase (α -KGDHc), branched-chain ketoacid dehydrogenase (BCKDHc) and ketoacid dehydrogenase (KADHc). Starting from malonyl-coenzyme A, mammalian mitochondrial fatty acid synthesis type II enables the modification of the acyl-carrier protein by a covalently linked octanoic acid. Then, the octanoic acid is transferred to the H subunit of GCS with the help of the

* Corresponding author.

E-mail address: audrey.boutron@aphp.fr (A. Boutron).

lipoyltransferase LIPT2, and two thiolate groups are added to form LA. The next step is performed by the lipoic acid synthase (LIAS), a [4Fe-4S] cluster-containing protein. Finally, LA is transferred by LIPT1 to target E2 subunits of ketoacid dehydrogenase complexes [3].

LIAS, a key protein of the LA synthesis pathway, coordinates two [4Fe-4S] clusters, which are critical for its activity [4]. The [Fe-S] cluster is a widespread prosthetic group found in proteins localized in most mammalian organelles, including mitochondria, cytosol and nucleus, but also in all the kingdoms of life. Their numerous functions vary from electron transfer to sulfur donor or gene expression regulation [5]. They are composed only of iron and inorganic sulfur and are found with different nuclearities. The two major [Fe-S] clusters are the [2Fe-2S] and [4Fe-4S] clusters. In many cases, the [Fe-S] cluster is necessary for enzymatic activity, as for LIAS [6]. Moreover, several subunits of respiratory chain (RC) complexes as complex I (eight subunits), complex II (SDHB subunit) and complex III (UQCRC1 or Rieske protein) also assemble [Fe-S] clusters, which are essential for OXPHOS electron transfer. Furthermore, ferrochelatase, a mitochondrial enzyme involved in the heme synthesis pathway, carries a [2Fe-2S] cluster [7], and mitochondrial aconitase (mt-aco), an enzyme of the tricarboxylic acid cycle, carries a [4Fe-4S] cluster [8].

The biogenesis of all mammalian [Fe-S] clusters starts in the mitochondrion, independently of the subcellular localization of the [Fe-S] protein (Fig. 1). Using inorganic sulfur provided by the cysteine desulfurase NFS1 complexed to ISD11 and ferrous ions, a [2Fe-2S] cluster is built on the scaffold protein ISCU with the help of ferredoxin (FDX1L) and frataxin (FXN). In a second step, the [2Fe-2S] cluster is transferred from ISCU to the glutaredoxin (GLRX5) with the help of the chaperone proteins HSPA9 and HSC20 [9]. Finally, the cluster is either transferred to target mitochondrial proteins or exported to the cytosol for the maturation of extra-mitochondrial proteins through the iron-sulfur exporter system. However, the exact nature of the exported component (ISC or sulfur) remains unknown [5]. This last step of the maturation of mitochondrial [Fe-S] proteins involves transfer factors, including IBA57, BOLA3, NFU1 and ISCA2 [10]. The specific roles of these proteins are still debated. It is proposed that all of them are required only for the maturation of [4Fe-4S]-containing mitochondrial proteins [11], with NFU1 and BOLA3 being more specifically involved in the specific maturation of LIAS, mt-aco and SDHB [8,9].

Since the first report of Cameron et al. in 2011 [12], various multiple mitochondrial dysfunctions syndromes (MMDS) have been reported involving mutations in genes encoding proteins involved in the Fe-S cluster biogenesis pathway, namely MMDS1 (NFU1), MMDS2 (BOLA3), MMDS3 (IBA57) and MMDS4 (ISCA2) [3,12–17], or in the

lipoic acid synthesis pathway (LIAS, LIPT1, and LIPT2) [16,18–21]. Recently, a new MMDS was described with mutations in *ISCA1* [22]. The clinical phenotypes of all these patients are very similar to those frequently observed in disorders concerning mitochondrial energy metabolism. In general, the presenting symptoms occur during the neonatal period or infancy. Common clinical presentations are neurological symptoms, including hypotonia, leukoencephalopathy, and psychomotor regression, but extraneurological symptoms have also been reported [23]. Biochemical studies show low PDHc enzymatic activity, but defects in RC complex activities are variably observed.

In this report, we describe 13 patients carrying mutations in genes encoding proteins involved either in lipoic acid synthesis (*LIPT1* and *LIPT2*) or in mitochondrial [Fe-S] cluster biogenesis (*NFU1*, *BOLA3*, *IBA57*, *ISCA2*, *FDX1L*). Ten of these patients are described here for the first time. Using their cultured skin fibroblasts, we established biochemical profiles (protein level and enzymatic activity) of several key mitochondrial proteins carrying either a [Fe-S] cluster or bound to lipoic acid. Since the development of next-generation sequencing technologies, molecular diagnosis of rare diseases is accelerating, but biochemical data are needed to improve our knowledge of these proteins and to help the formulation of new therapeutic approaches for present and future patients.

2. Materials and methods

2.1. Patients and cell culture

Thirteen patients with mutations in genes encoding proteins involved in either [Fe-S] cluster biogenesis or the LA synthesis pathway were included. The genotype of each patient is described in Table 1, patients P1, P2 and P8 having already been reported [19–21,24]. The integrated software ALAMUT V.2.7 (Interactive Biosoftware; <http://www.interactive-biosoftware.com>) was used for *in silico* analysis of missplicing effects. No novel mutations were reported as SNP variants in Exome Variant Server, NHLBI GO Exome Sequencing Project (ESP), Seattle, WA (<http://evs.gs.washington.edu/EVS/>) [March 2017 accessed]. Cultured skin fibroblasts from these patients and from individuals without mitochondrial disease (controls) were grown in HAM'S F-10 medium (Eurobio, Les Ulis, France) supplemented with antibiotics (100 IU/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin), 50 mg/L uridine and 12% fetal bovine serum. Cells were cultured at 37 °C in a humidified incubator with 5% CO₂. Clinical and biochemical data and brain magnetic resonance imaging (MRI) findings were collected retrospectively. Informed consent was obtained from all patients

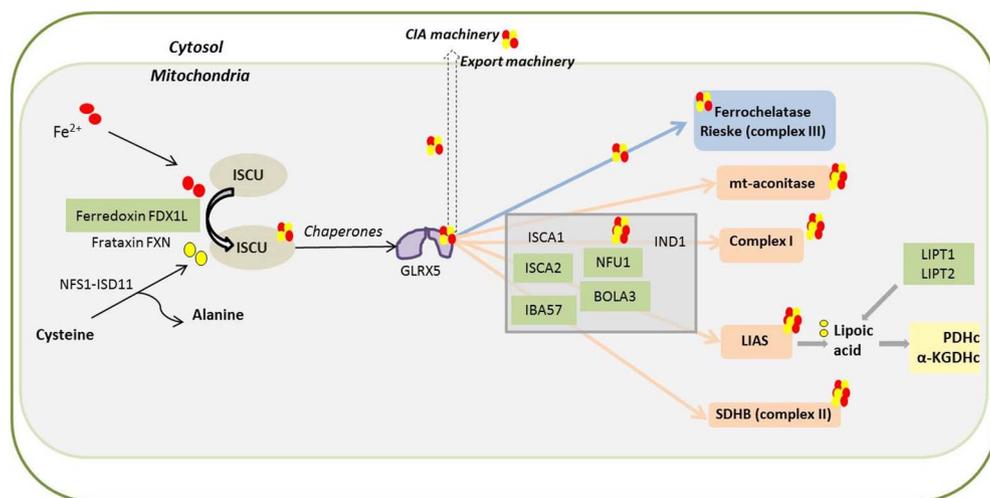


Fig. 1. Simplified scheme of human mitochondrial [Fe-S] protein biogenesis [5,9,23].

Starting from iron atoms and inorganic sulfur provided by cysteine desulfuration, a [2Fe-2S] cluster is built on the scaffold protein ISCU, with the help of NFS1 and ISD11. Ferredoxin serves as electron donor. In the second step, chaperone proteins transfer a [2Fe-2S] cluster from ISCU to GLRX5. The cluster can then be exported to the cytosol to integrate cytosolic Fe-S assembly (CIA) machinery or transferred to mitochondrial apo-protein, which needs one or several [2Fe-2S] or [4Fe-4S] clusters. For this, ISC targeting factors (ISCA1, ISCA2, IBA57, NFU1, BOLA3) are essential, but the exact role of each one is not yet clearly defined. Among [4Fe-4S] target proteins, lipoic acid synthase (LIAS) is a key enzyme in lipoic acid synthesis, and is covalently linked to mitochondrial ketoacid dehydrogenases such as PDHc and α KGDHc. Mutated proteins (green) found in the patients included in this study. Mitochondrial [4Fe-4S]- and [2Fe-2S]-containing

proteins (salmon and blue, respectively) and lipoylated proteins (yellow) studied in this report. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 1
Mutational spectrum of the thirteen patients.

Patient	Gene	Reference sequence	Allele 1			Allele 2		
			Nucleotide change	Protein change	Location	Nucleotide change	Protein change	Location
P1 ^a	<i>LIPT1</i>	NM_145199	c.535A > G	p.Thr179Ala	Exon 2	c.875C > G	p.Ser292*	Exon 2
P2 ^a	<i>LIPT2</i>	NM_001144869	c.89T > C	p.Leu30Pro	Exon 1	c.377T > G	p.Leu126Arg	Exon 1
P3	<i>BOLA3</i>	NM_212552	c.136C > T	p.Arg46*	Exon 2	c.136C > T	p.Arg46*	Exon 2
P4	<i>BOLA3</i>		c.136C > T	p.Arg46*	Exon 2	c.136C > T	p.Arg46*	Exon 2
P5	<i>NFU1</i>	NM_001002755	c.146del	p.Pro49Leufs*8	Exon 3	c.303-1988_c.369 + 1021del	p.?	Intron 3 to intron 4
P6	<i>NFU1</i>		c.622G > T	p.Gly208Cys	Exon 7	c.629G > T	p.Cys210Phe	Exon 7
P7	<i>NFU1</i>		c.179G > T	p.Phe60Cys	Exon 3	c.179G > T	p.Phe60Cys	Exon 3
P8 ^a	<i>NFU1</i>		c.565G > A	p.Gly189Arg	Exon 7	c.622G > T	p.Gly208Cys	Exon 7
P9	<i>IBA57</i>	NM_001010867	c.335T > G	p.Leu112Trp	Exon 1	c.437G > C	p.Arg146Pro	Exon 2
P10	<i>IBA57</i>		c.316A > G	p.Thr106Ala	Exon 1	c.738C > G	p.Asn246Lys	Exon 3
P11	<i>ISCA2</i>	NM_194279	c.154C > T	p.Leu52Phe	Exon 2	c.154C > T	p.Leu52Phe	Exon 2
P12	<i>ISCA2</i>		c.313A > G	p.Arg105Gly	Exon 4	c.313A > G	p.Arg105Gly	Exon 4
P13	<i>FDX1L</i>	NM_001031734	c.1A > T	p.Met1?	Exon 1	c.1A > T	p.Met1?	Exon 1

Mutations in bold are described for the first time in this publication. Nomenclature of variants is in accordance with the recommendations of the Human Genome Variation Society [31].

^a P1, P2 and P8 were already reported [19–21,24].

before inclusion in the study.

2.2. Biochemical studies

All biochemical analyses were performed on cultured skin fibroblasts. PDHc activity was measured as described [25]. RC complexes, α -KGDHc and citrate synthase activities were measured by spectrophotometric assay [26]. Assays of complex I and of mt-aco activity were performed on mitochondria-enriched fractions prepared from permeabilized cells with digitonin, as described previously [27,28]. RC complex and mt-aco activities were normalized to citrate synthase activity. Glutathione measurement was carried out on total fibroblast lysates [29].

2.3. Western blot and BN-PAGE analyses

Western blot analysis was performed on mitochondria-enriched fractions or on total fibroblast lysates. About 30 μ g of protein extracts was separated by SDS-PAGE and transferred to PVDF membranes, blocked in PBS-Tween containing 5% non-fat milk and then incubated overnight with primary antibodies. Antibodies against lipoic acid (LA) (Abcam, ab18724), PDH-E2 subunit (SantaCruz Biotechnology, sc-271352), NFU1 (kindly provided by Dr. T. Rouault, NICHD, NIH, Bethesda, USA), IBA57 (kindly provided by Prof. R. Lill, Marburg, Germany), SDHB (Abcam, ab14714), Rieske protein (Abcam, ab14746), LIAS (ThermoFisher Scientific, PA5-22387), ferrochelatase (kindly provided by Dr. H. Puccio, Strasbourg, France), mt-aconitase (kindly provided by Dr. R. B. Franklin, University of Maryland, Baltimore, USA) and prohibitin (Novusbio, NBP2-37563) were used. Secondary peroxidase-conjugated anti-mouse (Sigma-Aldrich, A4416) and anti-rabbit (Sigma-Aldrich, NA934V) antibodies were used. Detection was achieved using the ECL chemiluminescence kit (GE Healthcare) and G-Box (Syngene) associated with GeneSNAP software. For some experiments, goat anti-rabbit or anti-mouse IRDye[®] 800-conjugated secondary antibodies (LI-COR, Lincoln, USA) were used. Membranes were scanned with the Odyssey infrared imaging system and images were processed with the Image Studio Software (LI-COR, Lincoln, USA).

Blue-native PAGE (BN-PAGE) analysis was carried out on mitochondria-enriched fractions from fibroblasts [30]. Immunoblotting was performed using antibodies raised against the complex I subunit GRIM19 (Abcam, ab10240), the 70 kDa subunit of complex II (SDHA, Abcam, ab14715) and the complex III subunit core2 (UQCRC2, Abcam, ab14745).

3. Results

3.1. Patients

Thirteen children from 12 unrelated families were included in our study. Patients P3 and P4 were first cousins. The clinical, MRI and biochemical data are summarized in Table 2. Clinical presentations were mostly severe encephalopathy features with hypotonia, psychomotor delay since birth ($n = 2/13$) or neurological regression ($n = 7/13$). Epilepsy was noted in five patients. Pulmonary arterial hypertension was also reported in two of the four (P6 and P8) NFU1 patients. The only patient with normal neurological development was an FDX1L-deficient patient (P13), who presents recurrent acute episodes of rhabdomyolysis and muscular weakness. Onset began between four and five years of age. In most patients, first symptoms began during the first days or months of life. All the patients with *BOLA3* (P3 and P4), *NFU1* (P5 to P8), *IBA57* (P9 and P10) mutations and one *ISCA2* patient (P12) died before 3 years of age. The second *ISCA2* patient (P11) has a mild disease with isolated and non-progressive spastic paraplegia at 12 years of age. White matter abnormalities were usually found in patients with encephalopathy. Magnetic resonance spectroscopy showed a lactate peak in three (*LIPT1*, P1; *LIPT2*, P2; *NFU1*, P7) of the six tested patients (P1, P2, P5, P7, P8 and P13).

3.2. Biochemical results

3.2.1. Mitochondrial lipoylated proteins

PDHc activity was decreased in fibroblasts of all patients (Table 3). It extended from 0.04 to 0.95 nmol/min/mg of protein, corresponding to 3% to 79% of the lowest reference value (reference values: 1.20–3.10 nmol/min/mg of protein). α -KGDHc activity was decreased for all patients except for one NFU1 patient (P7) and the FDX1L patient (P13). PDHc and α -KGDHc activities were only moderately decreased in one *ISCA2* patient (P11). We measured the level of lipoylation of the E2 subunit of PDHc and α -KGDHc with an antibody against LA (Fig. 2A). We found a severely altered lipoylation in all patients except for one NFU1 patient (P7), one *ISCA2* patient (P11) and the FDX1L patient (P13), with the E2 subunit of PDHc detectable for all patients. This alteration of protein lipoylation is in accordance with decreased enzymatic activity (Table 3).

3.2.2. Mitochondrial Fe-S proteins

We focused on two [4Fe-4S] proteins, LIAS and mt-aco, and two [2Fe-2S] proteins, ferrochelatase and Rieske protein. LIAS activity is directly dependent on the assembly of its [4Fe-4S] cluster, which is

Table 2
Clinical and biochemical features of the thirteen patients.

Patient	Gene	Gender	Age at onset/age at death	Clinical presentation	Brain MRI	Lactate (mmol/L)		Glycine (μmol/L)		Other
						Plasma (RV < 2)	CSF (RV < 1.8)	Plasma (RV < 300)	CSF (RV < 16)	
P1	<i>LIP11</i>	Male	15 months/alive at 8 years	PMD, hypotonia, tetraparesis. Steady aortic root dilatation [19].	Cortical atrophy, delayed myelination. MRS: peak of lactate during decompensation.	8 at onset N at 8 years	6.6	< 300	< 16	Increase of 2 keto-glutarate (urine)
P2	<i>LIP12</i>	Male	Neonatal period/alive at 7 years	PMD, hypotonia, microcephaly, epilepsy [20,21].	Cortical atrophy, delayed myelination. MRS: peak of lactate.	4.5	< 1.8	419	ND	Increase of pyruvate (blood) and glycine (urine)
P3	<i>BOLA3</i>	Male	5 months/8 months	Neurological degradation, tetraparesis.	Diffuse demyelination.	3.2	2.4	600	43	
P4	<i>BOLA3</i>	Male	7 months/8 months	Hypotonia, pyramidal syndrome.	Diffuse demyelination. Leigh syndrome.	5.4	3.9	922	16	
P5	<i>NFUI</i>	Male	3 months/4 months	Hypotonia, seizures, apnea.	White matter abnormalities. MRS: no lactate peak.	3.6	< 1.8	374	15 (RV 4–11)	Increase of glycine and fumaric acid (urine)
P6	<i>NFUI</i>	Female	3.5 months/4 months	PMD, hypotonia, seizures, acute heart failure, PAHT.	No abnormalities.	> 2	ND	> 300	ND	Increase of 2-amino-adipate (plasma) Increase of 2 keto-adipate (urine)
P7	<i>NFUI</i>	Male	7 months/ < 3 years	Progressive neurological degradation. PMD, spasticity and epileptoid trepidation.	Necrotizing leukodystrophy. MRS: lactate peak.	> 2	ND	ND	ND	
P8	<i>NFUI</i>	Female	5 months/3 years	PMR, PAHT, hypotonia, tetraparesis, seizures [24].	Kystic leukoencephalopathy. MRS: no lactate peak.	2.7 (acute period)	< 1.8	1178	20	
P9	<i>IBA57</i>	Male	8 months/11 months	PMR, hypotonia, episodes of general hypertonia, pyramidal syndrome.	Periventricular leukodystrophy.	7.7	1.9	< 300	< 16	
P10	<i>IBA57</i>	Female	3 weeks/2.5 months	Hypotonia, myoclonus, apnea.	Myelination delay.	2	5.5	ND	ND	
P11	<i>ISCA2</i>	Male	ND/still alive at 12 years	Non-progressive spastic paraplegia.	White matter atrophy at 12 years.	< 2	< 1.8	ND	ND	
P12	<i>ISCA2</i>	Male	Neonatal/12 days	Hypotonia, apnea.	Leukodystrophy.	> 2	5	ND	ND	
P13	<i>FDX1L</i>	Female	5 years/still alive at 18 years	Acute episodes of rhabdomyolysis, muscular weakness.	Normal	Up to 23 in acute episodes	3	< 300	< 16	Increase of serum creatine kinase in acute episodes

CSF, cerebrospinal fluid; MRS, magnetic resonance spectroscopy; PAHT, pulmonary arterial hypertension; PMD, psychomotor delay; PMR, psychomotor regression; RV, reference values; ND, not determined.

Table 3
PDHc, α -KGDHc, mt-aco, respiratory chain complex activities and cellular glutathione concentration.

Patient	Gene	Enzymatic activities (nmol/min/mg protein)			Relative mt-aco and respiratory chain complex activities					Glutathione (pmol/mg protein)
		PDHc (RV:1.20-3.10)	α -KGDHc (RV:3.7-7.1)	Citrate synthase (CS) (RV:61-93)	mt-aco/CS (RV:0.40-0.59)	Complex I/CS (RV:0.15-0.41)	Complex II/CS (RV:0.20-0.32)	Complex III/CS (RV:0.70-1.40)	Complex IV/CS (RV:1.00-1.50)	
P1	<i>LIPT1</i>	0.08	0.5	59	0.20	0.04	0.24	1.18	1.61	18
P2	<i>LIPT2</i>	0.28	0.5	58	0.33	0.07	0.30	2.28	1.05	11
P3	<i>BOLA3</i>	0.05	1.6	70	0.18	<0.01	0.08	0.82	0.93	13
P4		0.07	0.7	84	0.34	0.03	0.09	1.18	0.78	25
P5	<i>NFU1</i>	0.15	0.1	64	0.35	0.01	0.12	2.66	0.90	20
P6		0.04	0.6	64	0.13	0.03	0.02	1.69	0.85	11
P7		0.56	11.5	120	0.24	0.02	0.34	1.47	1.45	14
P8		0.35	<0.1	81	0.30	<0.01	0.06	0.86	1.38	9
P9	<i>IBA57</i>	0.39	2.3	81	0.44	0.04	0.15	1.48	1.0	17
P10		0.54	1.1	105	0.40	0.04	0.07	0.9	1.3	19
P11	<i>ISCA2</i>	0.95	2.8	66	0.33	0.05	0.21	2.67	2.03	20
P12		0.09	0.3	101	0.20	0.04	0.15	4.18	1.38	12
P13	<i>FDX1L</i>	0.95	8.4	89	0.46	0.09	0.33	1.48	1.43	19

All the analyses were performed on cultured fibroblasts from the patients. Citrate synthase activity served as a reference for mitochondrial content in tested samples. mt-aco and RC complex activities were expressed relative to citrate synthase activity. Reduced glutathione measurement was determined in total lysates of fibroblasts. Gray shading indicates results in the normal value range. Other results were abnormal compared with reference values. CS, citrate synthase; RV, reference values.

essential for incorporation of sulfur residues into octanoic acid. LIAS protein was detectable for all patients and controls (Fig. 2B). LIAS activity, which was indirectly measured by the level of lipoylation of target proteins, was decreased in most patients with defects in [Fe-S] biogenesis (Fig. 2).

Then, we looked more closely at mt-aco, the stress-sensitive [4Fe-4S] cluster of which is also crucial for its enzymatic activity and stability [28,32]. Its activity was normalized to citrate synthase activity to avoid bias due to between-sample variability in mitochondrial content (Table 3). While mt-aco protein level was little affected (Fig. 3), its activity was decreased for all patients except for both IBA57 patients (P9 and P10) and the FDX1L patient (P13) (Table 3). Thus, low mt-aco activity is a consequence of the alteration of its [4Fe-4S] cluster. Given that glutathione (GSH) production is typically increased by severe oxidative stress [33], we measured total reduced GSH in cell lysates of fibroblasts, but found no significant variation between control and patient cells (Table 3).

Ferrochelatase assembles a [2Fe-2S] cluster, which is crucial for its stability and presents some sensitivity to oxidative stress [32,34]. We found that ferrochelatase level, and consequently the presence of the cluster, was moderately reduced for patients 1, 9 and 11 only (Fig. 4A).

3.2.3. OXPHOS analysis

Several subunits of RC complexes I, II and III carry [Fe-S] clusters that are essential to their activities. We looked first at the activity of RC complexes relative to citrate synthase activity (Table 3) and then at two [Fe-S] proteins of the RC complex, SDHB (complex II) (Fig. 4C) and Rieske protein (complex III) (Fig. 4B). Finally, we checked the integrity of RC complexes containing [Fe-S] clusters when activities were affected by BN-PAGE using antibodies against subunits that do not

coordinate an [Fe-S] cluster (Fig. 5).

Complex I activity was decreased in all patients (Table 1) and its assembly was also clearly affected in all of them except three patients, P1 (LIPT1 patient), P11 (ISCA2 patient) and P13 (FDX1L patient) (Fig. 5). Complex II activity and integrity were normal in LIPT1 (P1) and LIPT2 (P2) patients, in one NFU1 patient (P7) and in the FDX1L patient (P13) (Table 1 and Fig. 5). For these four patients, the amount of SDHB subunit was moderately decreased or normal (Fig. 4C). Concerning the other patients, complex II activity and assembly were compromised for eight patients (the two BOLA3 patients, P3 and P4; three of the four NFU1 patients, P5, P6, P8; the two IBA57 patients, P9 and P10; one of the two ISCA2 patients, P12) while one ISCA2 patient (P11) showed low normal activity of complex II and its assembly seemed to be only moderately affected. For these nine patients, SDHB was undetectable (Fig. 4C). So, complex II activity and/or integrity seems to be affected by defects in NFU1, BOLA3, IBA57 and ISCA2, proteins involved in the late step of mitochondrial [Fe-S] protein maturation. Conversely, complex III activity was normal in all patients, as was the amount of Rieske protein (Fig. 4B). Complex IV activity was moderately affected by defects in BOLA3 or NFU1 (P3 to P6).

The biochemical profile of patient P7 with a mutation in *NFU1* differed from that of other *NFU1* patients. First, lipoylation of PDH-E2 and α -KGDH-E2 and α -KGDHc activity were normal, while PDHc and mt-aco activities were clearly affected (Fig. 3 and Table 3). RC complex analysis showed only an effect on the activity and integrity of complex I (Table 3 and Fig. 5). These results contrasted with the findings concerning other *NFU1* patients (P5, P6 and P8) and underscored the various biochemical profiles in the same deficiency despite similar severe clinical features and a fatal outcome for all the *NFU1* patients.

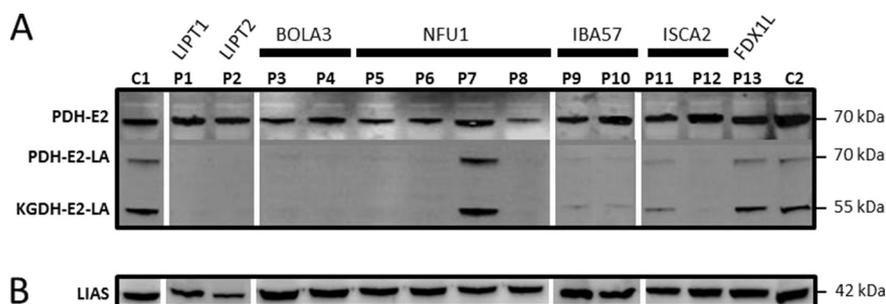


Fig. 2. Protein level of lipoylated proteins and lipoylation of PDHc and α -KGDHc in fibroblasts. Fibroblasts of the 13 patients and 2 controls (C1 and C2) were analyzed by immunoblot after mitochondrial enrichment. Antibodies against lipoylation of PDHc and α -KGDHc (detection of lipoylation of PDHc and α -KGDHc), E2 subunit of PDHc (A) and LIAS (B) were used.

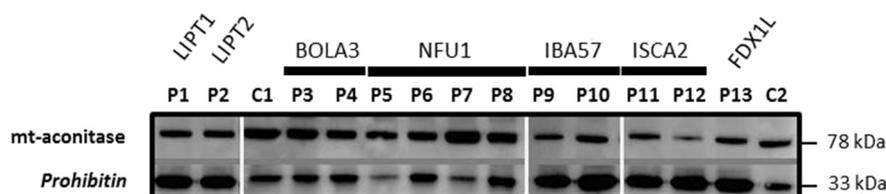


Fig. 3. Protein level of mt-aconitase in fibroblasts. Fibroblasts of the 13 patients and 2 controls (C1 and C2) were analyzed after mitochondrial enrichment by immunoblot with antibody against mt-aconitase. Prohibitin is shown as the loading control of mitochondrial content.

3.2.4. *NFU1* and *IBA57* protein level

Finally, we looked at the level of *NFU1* and *IBA57* proteins in the fibroblasts of patients presenting a mutation in one protein involved in the late steps of mitochondrial [Fe-S] cluster maturation (P3 to P12) (Fig. 6). As expected, *NFU1* protein was undetectable for the P5 *NFU1* patient, who carries one intragenic deletion and one point deletion. *NFU1* protein level was decreased for the two other *NFU1* patients (P6 and P8) presenting a point mutation in their *NFU1* gene and, more surprisingly, for both *BOLA3* patients (P3 and P4). *NFU1* level was not changed for the last *NFU1* patient (P7) or for *IBA57* (P9 and P10) and *ISCA2* (P11 and P12) patients. *IBA57* protein was seriously decreased in all patients presenting a mutation in a gene encoding a protein involved in the late steps of mitochondrial [Fe-S] cluster maturation (P3 to P12).

4. Discussion

We studied 13 patients with a mutation in a gene encoding a mitochondrial protein involved either in LA biosynthesis (*LIPT1* and *LIPT2*) or in [Fe-S] cluster biogenesis (*BOLA3*, *NFU1*, *IBA57*, *ISCA2* and *FDX1L*). Among these patients, ten are described for the first time in this manuscript with mutations in *BOLA3* (P3 and P4), *NFU1* (P5, P6, and P7), *IBA57* (P9 and P10), *ISCA2* (P11 and P12), and the second case with a mutation in *FDX1L* (P13). Deficiencies in those proteins are known to cause diseases with severe encephalopathy due to defects in mitochondrial OXPHOS and keto-dehydrogenases (PDHc and α -KGDHc) [23]. Conversely, *FDX1L* deficiency leads to a muscular

phenotype with normal neurological development [35]. In fact, PDHc and α -KGDHc are both active only when bound to LA, whose synthesis involves *LIAS*, a [4Fe-4S] cluster-containing protein. As a consequence, LA synthesis and keto-dehydrogenases activity are dependent on the mitochondrial [Fe-S] cluster biogenesis pathway. We performed biochemical analysis to assess the precise impacts of each mutation on both lipoylated proteins, but also on key mitochondrial [Fe-S] proteins (several subunits of respiratory chain complexes, ferrochelatase and mt-aco). As the analyses were carried out in the same conditions and tissue, *i.e.* skin fibroblast cultures, for all the patients, biochemical profiles can be compared to each other.

4.1. Fibroblasts from *LIPT1* and *LIPT2* patients

Both patients present similar brain imaging and clinical features with early-onset encephalopathy [19–21]. Up to now, four *LIPT1* patients have been described: P1 of our study [19] and three others [18,36], and three *LIPT2* patients have been reported one of whom was included in our study (P2, corresponding to Patient 1 described by Habarou et al.) [20,21]. P1 and P2 presented a decrease in PDHc and α -KGDHc activities due to a defect of lipoylation of the E2 subunits (Table 3, Fig. 2). Mt-aco is well known to be highly sensitive to cellular oxidative stress, which degrades its [4Fe-4S] cluster to a [3Fe-4S] cluster, and, consequently, decreases its enzymatic activity [37]. We observed an unexpected decrease in mt-aco activity for both subjects (Table 3), despite a normal amount of the protein (Fig. 3), indicating a

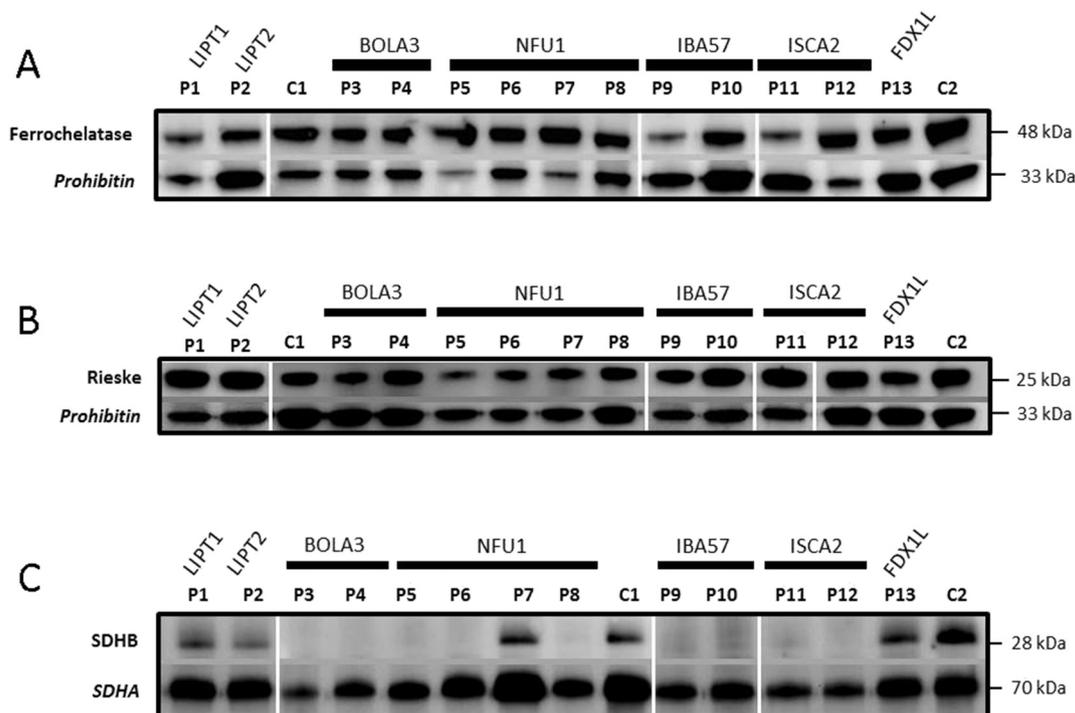


Fig. 4. Protein level of mitochondrial [Fe-S] proteins in fibroblasts. Fibroblasts of the 13 patients and 2 controls (C1 and C2) were analyzed after mitochondrial enrichment using antibodies against the [2Fe-2S]-containing ferrochelatase (panel A) and Rieske protein (panel B). Prohibitin served as the loading control. Panel C shows the level of the [4Fe-4S] protein SDHB, subunit or RC complex II. Antibody against SDHA, another subunit of respiratory chain complex II, without [Fe-S] clusters, is shown as the loading control of mitochondrial content.

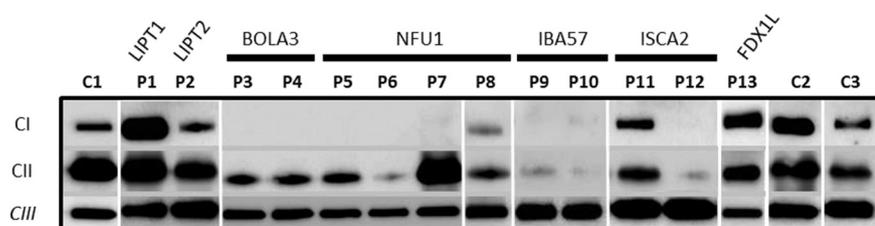


Fig. 5. Blue-native PAGE analysis of respiratory chain complexes I and II in fibroblasts. BN-PAGE analysis of mitochondria-enriched fibroblasts of the 13 patients and three controls (C1, C2 and C3) was performed using antibodies against respiratory chain complex subunits that do not coordinate an [Fe-S] cluster (CI: GRIM19, CII: SDHA). Complex III (subunit UQCRC2) served as the loading control, while the activity of complex III was not affected in all patients.

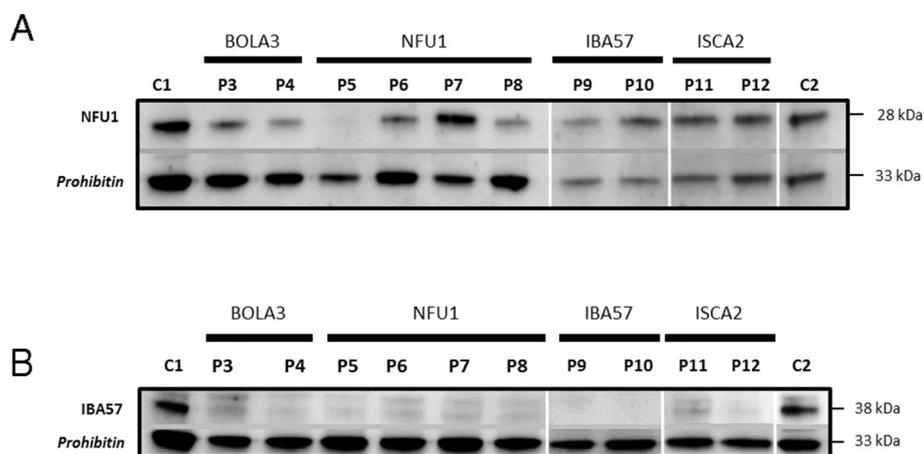


Fig. 6. NFU1 and IBA57 protein levels in fibroblasts. Fibroblasts of the 10 patients (patients with mutations in *LIPT1*, *LIPT2* and *FDX1L* were not included) and two controls (C1 and C2) were analyzed after mitochondrial enrichment using antibodies against NFU1 (A) and IBA57 (B). Prohibitin was used as the loading control of mitochondrial content. Unfortunately, the tested antibodies against BOLA3 and ISCA2 were not suitable for immunoblotting.

probable increase in oxidative stress in the fibroblasts of these patients. On the other hand, the [2Fe-2S] cluster of ferrochelatase is not necessary for catalytic activity, but is required for protein stability [34]. No strong variation in the level of ferrochelatase between patients and controls was observed (Fig. 4A). The hypothesis of increased oxidative stress in patients with lipoylation defects has previously been suggested to explain their clinical pulmonary hypertension [18]. There was no significant variation in the level of total reduced glutathione (GSH) between patient and control fibroblasts (Table 3). While the amounts of the oxidized form of glutathione (GSSG) were under the limit of detection of our assay, variations in the ratio between GSH and GSSG cannot be excluded. Surprisingly, complex I was also affected in both patients (Table 3, Fig. 5). These results confirm those obtained by polarographic study in both patients which showed low consumption of oxygen with pyruvate and malate [19,21]. To our knowledge, none of the subunits of this complex are lipoylated. However, a decrease of complex I following down-regulation of acyl-carrier protein, which is involved in octanoic acid synthesis, has been observed [38]. Moreover, LA supplementation is known to improve mitochondrial function [39], probably by increasing the efficiency of RNase P processing and, consequently, tRNA^{Pro} processing, which is essential for mitochondrial protein expression [40,41]. Lastly, the decreased activity and stability of complex I could also be a consequence of oxidative stress in these patients. Taken together, our results suggest that moderate oxidative stress may be present in the fibroblasts of these patients and leads to dysfunction of [Fe-S] proteins, which are highly sensitive to oxidative stress, like mt-aconitase and complex I, but has no effect on other [Fe-S] proteins that are less sensitive to oxidative stress, such as ferrochelatase. Clearly, LA deficiency induces OXPHOS dysfunction and more studies are needed to elucidate the molecular mechanism.

4.2. Fibroblasts from the *FDX1L* patient

Here we report the second case of ferredoxin deficiency. Both patients (P13 and [35]) carry the same homozygous mutation c.1A > T and present similar clinical features, with late onset of metabolic myopathy, recurrent episodes of rhabdomyolysis, hyperlactacidemia and muscular weakness. Neurological development is normal. *FDX1L* is

clearly involved in the first steps of mitochondrial [Fe-S] cluster biogenesis, steps that are necessary for the maturation of all the [Fe-S] clusters independently of their subcellular localization. The *FDX1L* patient (P13) presented with mild biochemical abnormalities (Table 3, Fig. 2) and a moderate decrease in SDHB protein level (Fig. 4C). Spiegel et al. observed an SDHA defect in fibroblasts and muscle of their patient with stronger OXPHOS deficiencies in muscle, with lower activity of complexes I and II in muscle than in fibroblasts [35]. Similar observations were reported previously with patients with *FXN* and *ISD11* defects [42,43], patients with motor deficiency as the major clinical feature, as observed in *FDX1L* patients. Muscle biopsy was not available for our *FDX1L* patient and we could not check whether deficiencies, particularly lipoylation of proteins, were also stronger in muscle than in fibroblasts. In conclusion, for *FDX1L* patients it would be appropriate to look at the deficiencies not only in fibroblasts but also in muscle to obtain a more significant biochemical signature.

4.3. Patients with defects in the late steps of the mitochondrial ISC machinery fibroblasts

We looked at 10 patients carrying mutations in four different proteins involved in the delivery of the [Fe-S] cluster to mitochondrial target proteins, namely NFU1, BOLA3, IBA57 and ISCA2. As with other patients previously described, they presented encephalopathy with early-onset and a fatal outcome for nine of them. One *ISCA2* patient (P11) was more moderately affected and still alive at 12 years (Table 2). In the current model for eukaryotic cells [10,41,44], NFU1 and BOLA3 serve for the maturation of some [4Fe-4S]-containing proteins such as LIAS, mt-aco and SDHB. Interestingly, all the patients we have studied are affected in complex I activity (Table 3) and integrity (except one *ISCA2* patient: P11) (Fig. 5). As for the *LIPT1* and *LIPT2* patients, the amount of ferrochelatase (Fig. 4A) and the GSH concentration (Table 3) are not significantly affected. Thus, for *ISCA2*, *IBA57*, and *BOLA3*, these results are in accordance with the model proposed by Lill's group, which positions these proteins downstream of *IND1* in the maturation of complex I [10]. But, according to this model, NFU1 is only dedicated to the maturation of SDHB and LIAS. The effects we observed in *NFU1* patients indicate that NFU1 is involved in complex I maturation, as

proposed by Cameron et al. [12].

Interestingly, all BOLA3, NFU1 and ISCA2 patients have a decreased amount of IBA57 (Fig. 6). It was shown previously that, in yeast, Iba57p physically interacts with Isa1p and Isa2p [45]. Due to the high homology of sequences between yeast and mammals, it is probable that IBA57 interacts with ISCA2 in mammals too, an interaction that would explain the effects of mutation in ISCA2 on IBA57 protein level. The effects of mutations in BOLA3 on IBA57 protein level indicate a link (cellular or physical interaction) between these two proteins.

Concerning [2Fe-2S] protein maturation, our results suggest that mutations in these four genes would not affect the maturation of the [2Fe-2S]-containing proteins (Rieske protein, ferredoxin). This is in agreement with the model for eukaryotic cells, which does not involve Nfu1 in the delivery of [2Fe-2S] clusters [9,46–48]. It seems that BOLA3, ISCA2 and IBA57 are not involved in this function either.

Six BOLA3 patients [12,16,17] and > 25 patients with NFU1 mutations have been reported to date [12,13,24,49,50]. The clinical and biochemical phenotypes of these two deficiencies are quite similar, with early onset of severe encephalopathy, variable cardiomyopathy, PDHc and mitochondrial RC defects (Tables 2 and 3). Our study includes two new BOLA3 patients (P3 and P4) carrying the known homozygous mutation p.Arg46* [12]. The four NFU1 patients presented early-onset encephalopathy and died before the age of three years. Two of them had pulmonary hypertension (P6 and P8), as is usually observed in patients carrying the same mutation p.Gly208Cys [49]. Patient P5 carries two heterozygous deletions in the NFU1 gene, leading to undetectable amounts of NFU1 protein in his fibroblasts and this can be considered as an almost complete NFU1 deficiency (Fig. 6A). This patient presents severe RC and mt-aco dysfunctions, and keto-dehydrogenases deficiency, secondary to lipoylation defects, resulting in severe clinical encephalopathy. This confirms that NFU1 is clearly involved in at least the maturation of [4Fe-4S] proteins such as LIAS, mt-aco and SDHB. In the case of patient P7, we observed a discrepancy between biochemical profiles (with unexpected normal α -KGDHc activity and protein lipoylation) and clinical features as previously reported for some patients [50]. But, our patient presents a point mutation (p.Phe60Cys) that does not affect NFU1 protein level. This mutation in the β 1 strand of the protein is predicted to be deleterious by *in silico* predicting softwares (SIFT, MutationTaster and PolyPhen-2). The recent NMR structure of NFU1 highlights the formation of a trimer of dimers of holo-NFU1 and the authors proposed that the β 1 strand might be involved in interaction with chaperones, which would help cluster transfer [47]. Thus, this mutation, which does not affect the stability of NFU1, might decrease the efficiency of cluster delivery to target proteins, which would explain the mild effects on biochemical profiles of the patient.

Both BOLA3 patients (P3 and P4) present low levels of NFU1 protein (Fig. 6A). These results are in accordance with studies in yeast showing that Bol3 forms a complex with Nfu1, stabilizes it and is involved in [4Fe-4S] cluster delivery [41]. Thus, in these patients, the mutation in BOLA3 affects both BOLA3 and NFU1 proteins. This explains the very severe clinical phenotype of all reported BOLA3 patients, with a cumulative effect of lack of both BOLA3 and NFU1 [17].

In our study, both IBA57 patients carry two heterozygous missense mutations, have no detectable IBA57 protein (Fig. 6B), and present a severe clinical phenotype with early onset and a fatal outcome. Of the 18 IBA57 patients already described, some suffer from severe diseases ($n = 4$), while others, all members of the same family, present chronic spastic paraplegia [14,51,52]. Clinical presentations of our two ISCA2 patients (P11 and P12), who both present novel missense mutations, are quite different, with neonatal onset and early death for patient P12, whereas patient P11, at 12 years of age, suffers from non-progressive spastic paraplegia (Table 2). Only 7 cases, from six unrelated families, of patients with ISCA2 mutations had been described before [15,53]. They presented spasticity and psychomotor delay, a clinical presentation quite similar to that observed for P11 (Table 1). One ISCA2 patient

(P12) showed marked decreases in the enzymatic activities of PDHc, α -KGDHc and RC complexes and in SDHB protein level, while the other one (P11) showed more limited effects in accordance with their respective clinical phenotypes. The molecular relation between IBA57 and ISCA proteins is still debated. Initially, it was considered that IBA57 acts with ISCA1 and ISCA2 in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S] proteins [11]. Then, it was proposed that ISCA proteins might form heterocomplexes without the help of IBA57 [54]. Finally, proteomic studies proposed that ISCA2 interacts with ISCA1, but also with GLRX5 and IBA57 [55]. As for patients with NFU1 and BOLA3 disorders, IBA57 patients have impaired lipoylation (Fig. 2) with decreased activities of PDHc and α -KGDHc (Table 3). RC complex defects were reported in most of the previous published cases of IBA57 deficiencies [14,51,56] and dysfunction of complexes I and II was observed in our two IBA57 patients. As for BOLA3 and NFU1 disorders, they are likely due to abnormal assembly of the [Fe-S] clusters held by subunits of these complexes. But, as previously observed in IBA57-depleted HeLa cells [11], mt-aco is not affected in these patients (Table 3 and Fig. 3). Thus, IBA57 protein may not be essential for [4Fe-4S] transfer to mt-aco protein, even if one IBA57 patient, carrying mutations compared with our patients, was recently reported with decreased mt-aco protein in fibroblasts [56].

4.4. Conclusion

We report two patients with mutations in either LIPT1 or LIPT2, one new patient with a mutation in FDX1L, a protein of the early steps of mitochondrial [Fe-S] cluster biogenesis, and ten patients, including nine new patients with deficiency in proteins (IBA57, BOLA3, NFU1, ISCA2) involved in the late steps of this same pathway. Clinical presentation was extremely severe with early fatal outcome for eight of them. Ferredoxin deficiency leads to severe myopathy with moderate mitochondrial protein dysfunction in fibroblasts. In all other deficiencies, PDHc and α -KGDHc activities and lipoylation of these enzymes were affected. OXPHOS was also affected. Interestingly, in all the patients, the integrity of complex I was affected and its activity was greatly reduced even in LIPT1 and LIPT2 patients. Similar observations were made for mt-aco activity. These decreases in activity of several mitochondrial [Fe-S] proteins in patients with mutations in either LIPT1 or LIPT2 may reflect an increase in oxidative stress, which degrades stress-sensitive [Fe-S] clusters. We confirm that ISCA2, NFU1, BOLA3 and IBA57 are involved only in the maturation of mitochondrial [4Fe-4S]-containing proteins and not [2Fe-2S]-containing proteins. Moreover, IBA57 does not seem to be involved in mt-aco maturation, as previously proposed using HeLa cells as model. BOLA3, NFU1 and ISCA2 are required for IBA57 stability and BOLA3 is required for NFU1 stability. These findings, summarized in a proposed scheme (Fig. 7), indicate the formation of multiple heterodimers between these four proteins, as already proposed for IBA57 and ISCA2 [11,54], and BOLA3 and NFU1 [41]. We cannot exclude that they form a larger complex including all four proteins.

Acknowledgements

The authors would like to thank Dr. Annabelle Chaussonot (Inherited Errors of Metabolism Reference Center, Hôpital de l'Archet, Nice, France) for providing clinical data on her patient. We thank Prof. R. Lill (Institut für Zytobiologie und Zytopathologie, Philipps-Universität Marburg, Marburg, Germany), Prof. T. Rouault (Molecular Medicine Program, Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development, Bethesda, USA), Dr H. Puccio (Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France) and Dr. R. B. Franklin (University of Maryland, Baltimore, USA) for sharing IBA57, NFU1, ferredoxin and mt-aconitase antibodies, respectively.

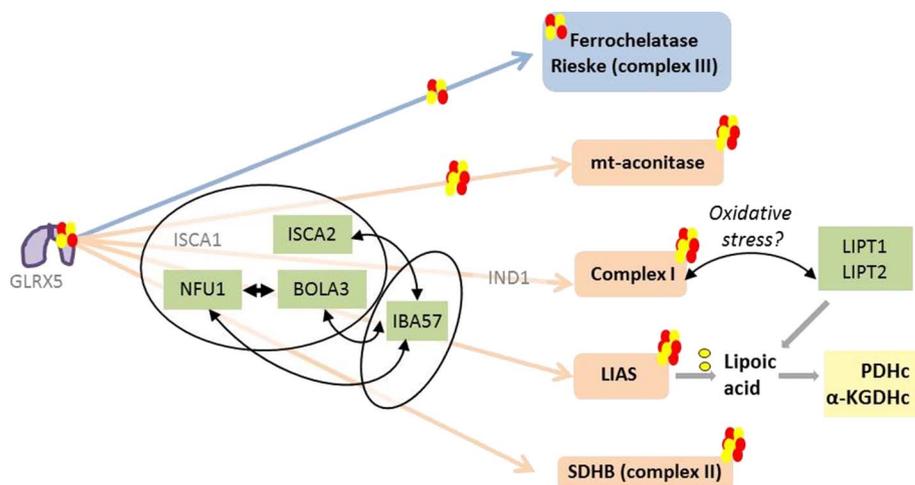


Fig. 7. Proposed scheme of human mitochondrial [Fe-S] protein biogenesis. The scheme summarizes the results obtained in our study. Arrows between BOLA3, NFU1, ISCA2, IBA57 symbolize the stabilizing effects we observed between these four proteins.

References

- [1] L. Packer, E.H. Witt, H.J. Tritschler, Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant, *Free Radic. Biol. Med.* 19 (1995) 227–250.
- [2] L.M. Román-Pintos, G. Villegas-Rivera, A.D. Rodríguez-Carrizalez, A.G. Miranda-Díaz, E.G. Cardona-Muñoz, Diabetic polyneuropathy in type 2 diabetes mellitus: inflammation, oxidative stress, and mitochondrial function, *J. Diabetes Res.* 2016 (2016) 3425617, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/3425617>.
- [3] J.A. Mayr, R.G. Feichtinger, F. Tort, A. Ribes, W. Sperl, Lipoic acid biosynthesis defects, *J. Inherit. Metab. Dis.* 37 (2014) 553–563, <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-014-9705-8>.
- [4] R.M. Cicchillo, L. Tu, J.A. Stromberg, L.M. Hoffart, C. Krebs, S.J. Booker, *Escherichia coli* quinolinate synthetase does indeed harbor a [4Fe-4S] cluster, *J. Am. Chem. Soc.* 127 (2005) 7310–7311, <http://dx.doi.org/10.1021/ja051369x>.
- [5] R. Lill, Function and biogenesis of iron-sulphur proteins, *Nature* 460 (2009) 831–838, <http://dx.doi.org/10.1038/nature08301>.
- [6] B.J. Landgraf, E.L. McCarthy, S.J. Booker, Radical S-adenosylmethionine enzymes in human health and disease, *Annu. Rev. Biochem.* 85 (2016) 485–514, <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-biochem-060713-035504>.
- [7] A. Sheftel, O. Stehling, R. Lill, Iron-sulfur proteins in health and disease, *Trends Endocrinol. Metab.* 21 (2010) 302–314, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tem.2009.12.006>.
- [8] L.K. Beilschmidt, H.M. Puccio, Mammalian Fe-S cluster biogenesis and its implication in disease, *Biochimie* 100 (2014) 48–60, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2014.01.009>.
- [9] N. Maio, T.A. Rouault, Iron-sulfur cluster biogenesis in mammalian cells: new insights into the molecular mechanisms of cluster delivery, *Biochim. Biophys. Acta* 2015 (1853) 1493–1512, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamer.2014.09.009>.
- [10] V.D. Paul, R. Lill, Snapshot: eukaryotic Fe-S protein biogenesis, *Cell Metab.* 20 (2014) 384–384.e1, <http://dx.doi.org/10.1016/j.cmet.2014.07.010>.
- [11] A.D. Sheftel, C. Wilbrecht, O. Stehling, B. Niggemeyer, H.-P. Elsässer, U. Mühlhoff, et al., The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation, *Mol. Biol. Cell* 23 (2012) 1157–1166, <http://dx.doi.org/10.1091/mbc.E11-09-0772>.
- [12] J.M. Cameron, A. Janer, V. Levandovskiy, N. Mackay, T.A. Rouault, W.-H. Tong, et al., 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 (2011) 486–495, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.08.011>.
- [13] U. Ahting, J.A. Mayr, A.V. Vanlander, S.A. Hardy, S. Santra, C. Makowski, et al., Clinical, biochemical, and genetic spectrum of seven patients with NFU1 deficiency, *Front. Genet.* 6 (2015) 123, <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2015.00123>.
- [14] N. Ajit Bolar, A.V. Vanlander, C. Wilbrecht, N. Van der Aa, J. Smet, B. De Paep, et al., Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene IBA57 causes severe myopathy and encephalopathy, *Hum. Mol. Genet.* 22 (2013) 2590–2602, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddt107>.
- [15] Z.N. Al-Hassnan, M. Al-Dosary, M. Alfdhel, E.A. Faqeh, M. Alsagob, R. Kenana, et al., ISCA2 mutation causes infantile neurodegenerative mitochondrial disorder, *J. Med. Genet.* 52 (2015) 186–194, <http://dx.doi.org/10.1136/jmedgenet-2014-102592>.
- [16] P.R. Baker, M.W. Friederich, M.A. Swanson, T. Shaikh, K. Bhattacharya, G.H. Scharer, et al., Variant nonketotic hyperglycinemia is caused by mutations in LIAS, BOLA3 and the novel gene GLRX5, *Brain* 137 (Pt 2) (2014) 366–379, <http://dx.doi.org/10.1093/brain/awt328>.
- [17] T.B. Haack, B. Rolinski, B. Haberberger, F. Zimmermann, J. Schum, V. Strecker, et al., Homozygous missense mutation in BOLA3 causes multiple mitochondrial dysfunctions syndrome in two siblings, *J. Inherit. Metab. Dis.* 36 (2013) 55–62, <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-012-9489-7>.
- [18] F. Tort, X. Ferrer-Cortès, M. Thió, A. Navarro-Sastre, L. Matalonga, E. Quintana, et al., Mutations in the lipoyltransferase LIPT1 gene cause a fatal disease associated with a specific lipoylation defect of the 2-ketoacid dehydrogenase complexes, *Hum. Mol. Genet.* 23 (2014) 1907–1915, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddt585>.
- [19] Y. Soreze, A. Boutron, F. Habarou, C. Barnerias, L. Nonnenmacher, H. Delpech, et al., Mutations in human lipoyltransferase gene LIPT1 cause a Leigh disease with secondary deficiency for pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase, *Orphanet J. Rare Dis.* 8 (2013) 192, <http://dx.doi.org/10.1186/1750-1172-8-192>.
- [20] F. Habarou, Y. Hamel, C. Grisel, A. Boutron, A. Delahodde, R. Gazah, et al., Encephalopathy, combined deficiency of alpha-ketoacid dehydrogenases and hyperglycinemia associated with LIPT2 mutations: a novel lipoic acid biosynthesis defect, *J. Inherit. Metab. Dis.* 38 (Suppl. 1) (2015) S48.
- [21] F. Habarou, Y. Hamel, T.B. Haack, R.G. Feichtinger, E. Lebigot, I. Marquardt, et al., Biallelic mutations in LIPT2 cause a mitochondrial lipoylation defect associated with severe neonatal encephalopathy, *Am. J. Hum. Genet.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2017.07.001> (S0002-9297(17)30279-3).
- [22] A. Shukla, M. Hebbbar, A. Srivastava, R. Kadavigere, P. Uppahyay, A. Kanthi, et al., Homozygous p.(Glu87Lys) variant in ISCA1 is associated with a multiple mitochondrial dysfunctions syndrome, *J. Hum. Genet.* (2017), <http://dx.doi.org/10.1038/jhg.2017.35>.
- [23] F. Tort, X. Ferrer-Cortès, A. Ribes, Differential diagnosis of lipoic acid synthesis defects, *J. Inherit. Metab. Dis.* 39 (2016) 781–793, <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-016-9975-4>.
- [24] M. Nizon, A. Boutron, N. Boddart, A. Slama, H. Delpech, C. Sardet, et al., Leukoencephalopathy with cysts and hyperglycinemia may result from NFU1 deficiency, *Mitochondrion* 15 (2014) 59–64, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2014.01.003>.
- [25] A. Imbard, A. Boutron, C. Vequaud, M. Zater, P. De Lonlay, H. Ogier de Baulny, et al., Molecular characterization of 82 patients with pyruvate dehydrogenase complex deficiency. Structural implications of novel amino acid substitutions in E1 protein, *Mol. Genet. Metab.* 104 (2011) 507–516, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ymgme.2011.08.008>.
- [26] P. Rustin, D. Chretien, T. Bourgeron, B. Gérard, A. Rötig, J.M. Saudubray, et al., Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies, *Clin. Chim. Acta* 228 (1994) 35–51, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7955428>.
- [27] D. Chretien, P. Bénit, M. Chol, S. Lebon, A. Rötig, A. Munnich, et al., Assay of mitochondrial respiratory chain complex I in human lymphocytes and cultured skin fibroblasts, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 301 (2003) 222–224.
- [28] J.-C. Drapier, J.B. Hibbs, [3] Aconitases: a class of metalloproteins highly sensitive to nitric oxide synthesis, *Methods Enzymol.* 269 (1996) 26–36.
- [29] M. Kelly-Aubert, S. Trudel, J. Fritsch, T. Nguyen-Khoa, M. Baudouin-Legros, S. Moriceau, et al., GSH monoethyl ester rescues mitochondrial defects in cystic fibrosis models, *Hum. Mol. Genet.* 20 (2011) 2745–2759.
- [30] S. Hescot, A. Slama, A. Lombès, A. Paci, H. Remy, S. Leboulleux, et al., Mitotane alters mitochondrial respiratory chain activity by inducing cytochrome c oxidase defect in human adrenocortical cells, *Endocr. Relat. Cancer* 20 (2013) 371–381, <http://dx.doi.org/10.1530/ERC-12-0368>.
- [31] J.T. den Dunnen, R. Dalgleish, D.R. Maglott, R.K. Hart, M.S. Greenblatt, J. McGowan-Jordan, et al., HGVS recommendations for the description of sequence variants: 2016 update, *Hum. Mutat.* 37 (2016) 564–569, <http://dx.doi.org/10.1002/humu.22981>.
- [32] B. Guillon, A.-L. Bulteau, M. Wattenhofer-Donzé, S. Schmucker, B. Friguet, H. Puccio, et al., Frataxin deficiency causes upregulation of mitochondrial Lon and ClpP proteases and severe loss of mitochondrial Fe-S proteins, *FEBS J.* 276 (2009) 1036–1047, <http://dx.doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06847.x>.
- [33] H.J. Forman, H. Zhang, A. Rinna, Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis, *Mol. Asp. Med.* 30 (2009) 1–12, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.006>.
- [34] D.R. Crooks, M.C. Ghosh, R.G. Haller, W.H. Tong, T.A. Rouault, Posttranslational stability of the heme biosynthetic enzyme ferrochelatase is dependent on iron availability and intact iron-sulfur cluster assembly machinery, *Blood* 115 (2010) 860–869.
- [35] R. Spiegel, A. Saada, J. Halvardson, D. Soiferman, A. Shaag, S. Edvardson, et al.,

- Deleterious mutation in FDX1L gene is associated with a novel mitochondrial muscle myopathy, *Eur. J. Hum. Genet.* 22 (2014) 902–906, <http://dx.doi.org/10.1038/ejhg.2013.269>.
- [36] V. Taché, L. Bivina, S. White, J. Gregg, J. Deignan, S.A. Boyadjiev, et al., Lipoyltransferase 1 gene defect resulting in fatal lactic acidosis in two siblings, *Case Rep. Obstet. Gynecol.* 2016 (2016) 6520148, <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6520148>.
- [37] O.V. Lushchak, M. Piroddi, F. Galli, V.I. Lushchak, Aconitase post-translational modification as a key in linkage between Krebs cycle, iron homeostasis, redox signaling, and metabolism of reactive oxygen species, *Redox Rep.* 19 (2014) 8–15, <http://dx.doi.org/10.1179/1351000213Y.0000000073>.
- [38] D. Feng, A. Witkowski, S. Smith, Down-regulation of mitochondrial acyl carrier protein in mammalian cells compromises protein lipoylation and respiratory complex I and results in cell death, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 11436–11445, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.M806991200>.
- [39] P. Arivazhagan, K. Ramanathan, C. Panneerselvam, Effect of DL-alpha-lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats, *Chem. Biol. Interact.* 138 (2001) 189–198 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11672700> (Accessed 29 Apr 2014).
- [40] J.K. Hiltunen, M.S. Schonauer, K.J. Autio, T.M. Mittelmeier, A.J. Kastaniotis, C.L. Dieckmann, Mitochondrial fatty acid synthesis type II: more than just fatty acids, *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 9011–9015, <http://dx.doi.org/10.1074/jbc.R800068200>.
- [41] A. Melber, U. Na, A. Vashisht, B.D. Weiler, R. Lill, J.A. Wohlschlegel, et al., Role of Nfu1 and Bol3 in iron-sulfur cluster transfer to mitochondrial clients, *elife* (5 August 2016), <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.15991>.
- [42] A. Rötig, P. de Lonlay, D. Chretien, F. Foury, M. Koenig, D. Sidi, et al., Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia, *Nat. Genet.* 17 (1997) 215–217, <http://dx.doi.org/10.1038/ng1097-215>.
- [43] S.C. Lim, M. Friemel, J.E. Marum, E.J. Tucker, D.L. Bruno, L.G. Riley, et al., Mutations in LYRM4, encoding iron-sulfur cluster biogenesis factor ISD11, cause deficiency of multiple respiratory chain complexes, *Hum. Mol. Genet.* 22 (2013) 4460–4473, <http://dx.doi.org/10.1093/hmg/ddt295>.
- [44] M.A. Uzarska, V. Nasta, B.D. Weiler, F. Spantgar, S. Ciofi-Baffoni, M.R. Saviello, et al., Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron-sulfur proteins, *elife* 5 (2016), <http://dx.doi.org/10.7554/eLife.16673>.
- [45] C. Gelling, I.W. Dawes, N. Richhardt, R. Lill, U. Mühlhoff, Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes, *Mol. Cell. Biol.* 28 (2008) 1851–1861, <http://dx.doi.org/10.1128/MCB.01963-07>.
- [46] W.-H. Tong, G.N.L. Jameson, B.H. Huynh, T.A. Rouault, Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 9762–9767, <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1732541100>.
- [47] K. Cai, G. Liu, R.O. Frederick, R. Xiao, G.T. Montelione, J.L. Markley, Structural/functional properties of human NFU1, an intermediate [4Fe-4S] carrier in human mitochondrial iron-sulfur cluster biogenesis, *Structure* 24 (2016) 2080–2091, <http://dx.doi.org/10.1016/j.str.2016.08.020>.
- [48] O. Stehling, R. Lill, The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis: mechanisms, connected processes, and diseases, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 3 (2013) 1–17 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23986915> (Accessed 29 Jan 2015).
- [49] F. Invernizzi, A. Ardisson, E. Lamantea, B. Garavaglia, M. Zeviani, L. Farina, et al., Cavitating leukoencephalopathy with multiple mitochondrial dysfunction syndrome and NFU1 mutations, *Front. Genet.* 5 (2014) 412, <http://dx.doi.org/10.3389/fgene.2014.00412>.
- [50] X. Ferrer-Cortés, J. Narbona, N. Bujan, L. Matalonga, M. Del Toro, J.A. Arranz, et al., A leaky splicing mutation in NFU1 is associated with a particular biochemical phenotype. Consequences for the diagnosis, *Mitochondrion* 26 (2016) 72–80, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mito.2015.12.004>.
- [51] F.-G. Debray, C. Stümpfig, A.V. Vanlander, V. Dideberg, C. Josse, J.-H. Caberg, et al., Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene IBA57 causes fatal infantile leukodystrophy, *J. Inher. Metab. Dis.* 38 (2015) 1147–1153, <http://dx.doi.org/10.1007/s10545-015-9857-1>.
- [52] A. Lossos, C. Stümpfig, G. Stevanin, M. Gaussen, B.-E. Zimmerman, E. Mundwiler, et al., Fe/S protein assembly gene IBA57 mutation causes hereditary spastic paraplegia, *Neurology* 84 (2015) 659–667, <http://dx.doi.org/10.1212/WNL.0000000000001270>.
- [53] U. Ahting, B. Rolinski, T.B. Haack, J.A. Mayr, B. Alhaddad, H. Prokisch, et al., FeS cluster biogenesis defect in a patient with mutations in ISCA2, *J. Inher. Metab. Dis.* 38 (Suppl. 1) (2015) S218.
- [54] D. Brancaccio, A. Gallo, M. Mikolajczyk, K. Zovo, P. Palumaa, E. Novellino, et al., Formation of [4Fe-4S] clusters in the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly machinery, *J. Am. Chem. Soc.* 136 (2014) 16240–16250, <http://dx.doi.org/10.1021/ja507822j>.
- [55] L.K. Beilschmidt, S. Ollagnier de Choudens, M. Fournier, I. Sanakis, M.-A. Hograindleur, M. Clémancey, et al., ISCA1 is essential for mitochondrial Fe4S4 biogenesis in vivo, *Nat. Commun.* 8 (2017) 15124, <http://dx.doi.org/10.1038/ncomms15124>.
- [56] A. Torraco, A. Ardisson, F. Invernizzi, T. Rizza, G. Fiermonte, M. Niceta, et al., Novel mutations in IBA57 are associated with leukodystrophy and variable clinical phenotypes, *J. Neurol.* 264 (2017) 102–111, <http://dx.doi.org/10.1007/s00415-016-8312-z>.

1.2 Résultats complémentaires

1.2.1 Le complexe IV est affecté par le déficit en LIPT2 et en IBA57, ISCA2, BOLA3 et NFU1, protéines de la voie de maturation des protéines Fe-S

J'ai complété l'étude de l'intégrité des complexes I, II et III de la CRM présentée dans l'article par l'étude du complexe IV par BN-PAGE. A la différence des complexes I, II, et III, le complexe IV possède deux centres hémiques mais ne contient pas de centres Fe-S. La Figure 27 montre les résultats des analyses des complexes I, II, III et IV de la CRM par BN-PAGE pour les 13 patients étudiés.

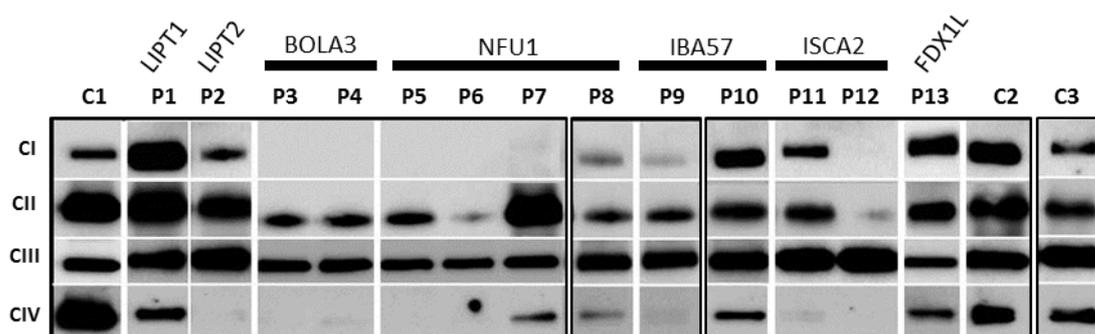


Figure 27 : Etude des complexes I, II, III et IV par BN-PAGE dans les fibroblastes de 13 patients.

C1, C2, C3 : fibroblastes contrôles. P1 à P13 : patients présentant une mutation dans le gène précisé. Les anticorps dirigés contre GRIM19 (complexe I, CI), SDHA (complexe II, CII), UQCRC2 (complexe III, CIII) et MTCO1 (complexe IV, CIV) ont été utilisés.

Chez les sujets contrôles (C1, C2 et C3), le complexe IV est en quantité équivalente ou supérieure à celle du complexe I. A l'inverse, pour tous les patients, l'intégrité du complexe IV est altérée. Le complexe IV est indétectable par BN-PAGE, chez huit des treize patients (LIPT2 (P2), BOLA3 (P3, P4), NFU1 (P5, P6), IBA57 (P9) ou ISCA2 (P11, P12)). Pour les cinq autres patients (LIPT1 (P1), NFU1 (P7 et P8), IBA57 (P10) et FDX1L (P13)), le complexe IV est présent mais en moindre quantité. Ces résultats sont étonnants puisque le complexe IV ne contient pas de centre Fe-S et n'est pas non plus une protéine lipoylée. Ces résultats peuvent être confrontés à ceux de l'activité enzymatique du complexe IV présentés dans la Table 3 de l'article. Pour 4 patients seulement (P3 et P4 (BOLA3), P5 et P6 (NFU1)),

l'activité enzymatique du complexe IV (rapportée à celle de la citrate synthase) est diminuée, ce qui est compatible avec le résultat du BN-PAGE sur lequel le complexe IV n'est pas détecté. Inversement, pour les neuf autres patients (LIPT1, LIPT2, NFU1 (P7 et P8), IBA57, ISCA2 et FDX1L (P9 à P13), l'activité enzymatique relative du complexe IV n'est pas diminuée alors que le résultat du BN-PAGE de ces patients (sauf le patient LIPT1), montre que l'intégrité du complexe IV est fortement altérée. Ces résultats discordants pourraient s'expliquer par le fait que les supercomplexes auxquels appartient le complexe IV sont déstabilisés. Le complexe IV forme un supercomplexe avec le complexe I de type $I_1III_2IV_1$, $I_1III_2IV_2$ (Schägger & Pfeiffer 2001; R. Guo et al. 2017) et le défaut d'intégrité du complexe I mis en évidence dans les fibroblastes des patients pourrait entraîner une déstabilisation du supercomplexe formé entre les complexes I, III et IV. Si le complexe IV ne peut s'associer avec le complexe I au sein du supercomplexe, il pourrait être plus rapidement dégradé et donc non ou moins détectable par BN-PAGE. Cependant, une étude réalisée dans des cellules HeLa déplétées en IND1 (NUBPL), facteur d'assemblage de protéines Fe-S du complexe I, va à l'encontre de cette hypothèse (Sheftel et al. 2009). Cette équipe a mis en évidence qu'une diminution du supercomplexe formé par les complexes I, III et IV, par défaut d'assemblage du complexe I, entraînait une augmentation de l'assemblage des complexes III et IV pour former un supercomplexe III_2IV_1 . De plus, le complexe IV serait à 85% sous forme libre, et seulement 15% associés à un supercomplexe (Schägger & Pfeiffer 2001). En conclusion, il semble peu probable que le déficit du complexe IV (défaut d'intégrité et/ou d'activité enzymatique) soit une conséquence directe du déficit du complexe I. Le complexe IV portant deux centres héminiques, son activité pourrait être diminuée par défaut de synthèse de l'hème. Cette voie de synthèse est dépendante de l'activité d'une enzyme à centre [2Fe-2S], la ferrochélatase. Cependant, cette protéine n'est affectée chez aucun des patients étudiés. Il n'y aurait donc pas de défaut de synthèse de l'hème dans les anomalies de la biogenèse des centres Fe-S retrouvées chez les patients étudiés. Une autre hypothèse est que le défaut d'intégrité du complexe IV est secondaire au déficit d'acide lipoïque mitochondrial dans les fibroblastes. En effet, l'acide lipoïque, en plus de son rôle antioxydant, aurait un rôle dans la traduction des protéines mitochondriales sans que le mécanisme ne soit clairement établi (Hiltunen et al. 2009). Cette hypothèse est confortée par des résultats expérimentaux chez la levure (Melber et al. 2016) qui ont montré un déficit

de la protéine COX2, sous unité du complexe IV et de protéines du complexe III chez la levure *S. cerevisiae* déplétée en Nfu1, suggérant une atteinte de la synthèse protéique mitochondriale. Ces anomalies sont plus modérées dans les levures déplétées en Bol3 ou en Bol3 et Bol1. Chez l'homme, le déficit de la lipoylation des protéines est aussi marqué dans les déficits en BOLA3 que dans les déficits en NFU1. Le déficit de l'activité du complexe IV a été mis en évidence chez certains de nos patients BOLA3 et NFU1, chez quelques patients IBA57 (Ajit Bolar et al. 2013; Torracco et al. 2017), un patient BOLA3 (Nishioka et al. 2018) et quelques patients NFU1 (Cameron et al. 2011; Ahting et al. 2015) dans la littérature. Le fait que l'intégrité du complexe IV soit altérée dans les fibroblastes de patients déficitaires en NFU1, mais aussi dans les déficits en BOLA3, ISCA2, IBA57 et LIPT2 suggère bien qu'il existe un mécanisme commun d'atteinte du complexe IV, par le déficit en acide lipoïque mis en évidence chez tous ces patients, mais par une autre voie que l'atteinte de la synthèse mitochondriale de protéines. Le défaut d'intégrité du complexe IV pourrait être la conséquence d'une instabilité de l'homéostasie rédox, secondaire à la baisse quantitative de l'acide lipoïque qui est un antioxydant majeur. Il a été montré qu'en cas de stress oxydatif lié à l'hypoxie, l'activité du complexe IV est effondrée (Srinivasan et al. 2013) via des mécanismes de régulation des sous-unités du complexe IV par phosphorylation ou déphosphorylation (Fang et al. 2007). Il est donc intéressant d'évaluer le niveau de stress oxydatif dans les cellules des patients. J'ai réalisé ces expérimentations dans les cellules de patients traitées ou non par de l'acide lipoïque. Ces résultats seront présentés dans le paragraphe 2 de ce chapitre (p.109).

1.2.2 L'immortalisation des fibroblastes ne modifie pas leur profil biochimique mitochondrial

A la suite de ces premières expérimentations, les subcultures de fibroblastes des patients avaient déjà un nombre de passages assez élevés ce qui m'a amenée à réfléchir sur le matériel cellulaire qui pouvait être utilisé pour la continuité de ce travail. En effet, ce travail pouvait être arrêté à tout moment si les fibroblastes entraient en sénescence. La plupart des patients étant décédés, il n'y avait pas d'autre prélèvement disponible. Dans un premier temps, j'ai choisi de me focaliser sur les patients déficitaires en BOLA3, NFU1, ISCA2 et IBA57. Plusieurs alternatives

étaient alors possibles. D'une part, l'utilisation de lignées de fibroblastes (type MRC5) déplétés du gène d'intérêt (*NFU1*, *BOLA3*, *ISCA2*, *IBA57*), avec ou non surexpression du gène muté, de façon stable ou bien par siRNA, était une première possibilité. D'autre part, l'immortalisation des cultures de fibroblastes issues de patients était une autre possibilité. Cette technique utilise un rétrovirus et requiert un laboratoire agréé pour la modification génétique de cellules humaines. Elle semblait préférable afin d'utiliser un matériel biologique le plus proche possible des fibroblastes, utilisés pour le début de cette étude. L'unité INSERM U-1185, UMS-32 Institut Biomédical de Bicêtre I2B, dirigée par Marc Lombès, située à la Faculté de Médecine Paris Sud, disposait de cette technologie et de l'agrément nécessaire pour la mise en place de l'expérimentation. J'ai donc réalisé l'immortalisation des fibroblastes de 4 patients (P4 (*BOLA3*), P8 (*NFU1*), P10 (*IBA57*) et P12 (*ISCA2*)) et de 4 témoins en deux séries, par intégration virale du gène de la télomérase humaine pour augmenter l'expression de cette enzyme. Le choix des fibroblastes à immortaliser répondait à deux critères qui sont le gène muté et la capacité de division cellulaire. Ainsi, parmi les deux patients avec un déficit en *IBA57* (P9 et P10), les cellules du patient P10 ont été choisies car les fibroblastes du patient P9 avaient une capacité de division cellulaire très faible.

Après immortalisation, la vitesse de division cellulaire a été satisfaisante pour toutes les cellules de témoins sauf pour celles d'un témoin, immortalisées dans la première série, ce qui a empêché leur utilisation dans des expériences ultérieures. L'analyse moléculaire du gène d'intérêt a été réalisée afin de vérifier que les cellules immortalisées des 4 patients avaient conservé l'anomalie génétique qui les caractérise. A la fin de la première série d'immortalisation des deux lignées (P4 (*BOLA3*) et P8 (*NFU1*)), les caractéristiques biochimiques des cellules immortalisées ont été vérifiées et comparées avec celles des cellules avant immortalisation, comparativement à des cellules « témoins » immortalisées dans les mêmes conditions (Figure 28).

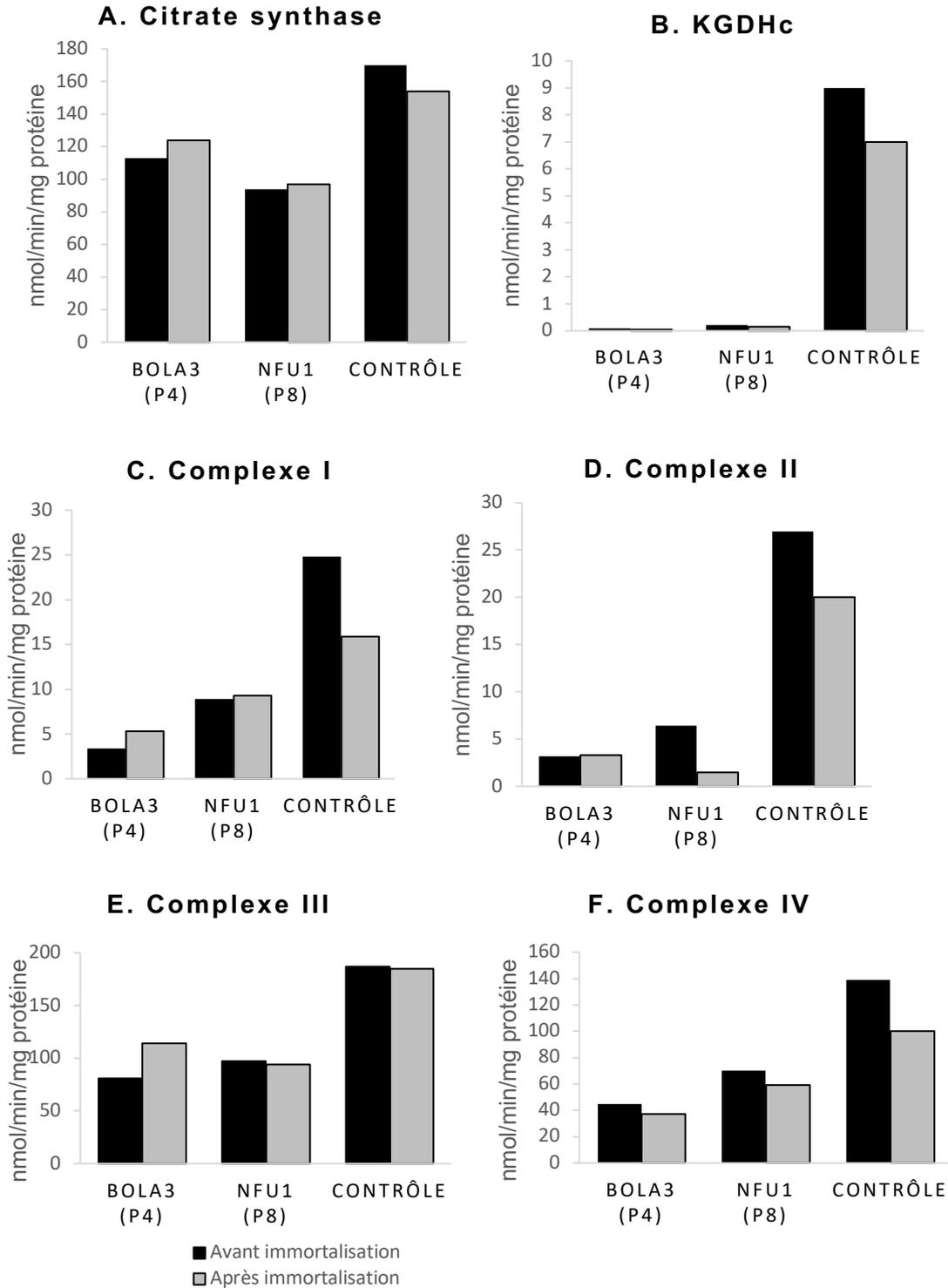


Figure 28 : Comparaison des activités enzymatiques d'enzymes du cycle de Krebs et de complexes de la CRM des fibroblastes avant et après immortalisation.

L'analyse est réalisée sur les fibroblastes de deux patients (P4 (BOLA3) et P8 (NFU1)) et d'un témoin (contrôle), immortalisés dans la même série. A : citrate synthase (enzyme de contrôle), B : KGDHc, C : complexe I, D : complexe II, E : complexe III, F : complexe IV. Barre noire : résultat avant immortalisation, barre grise : résultat après immortalisation. Chaque barre représente une expérience, réalisée dans des fractions enrichies en mitochondries à partir de culots de fibroblastes. Toutes les mesures d'activité ont été réalisées le même jour.

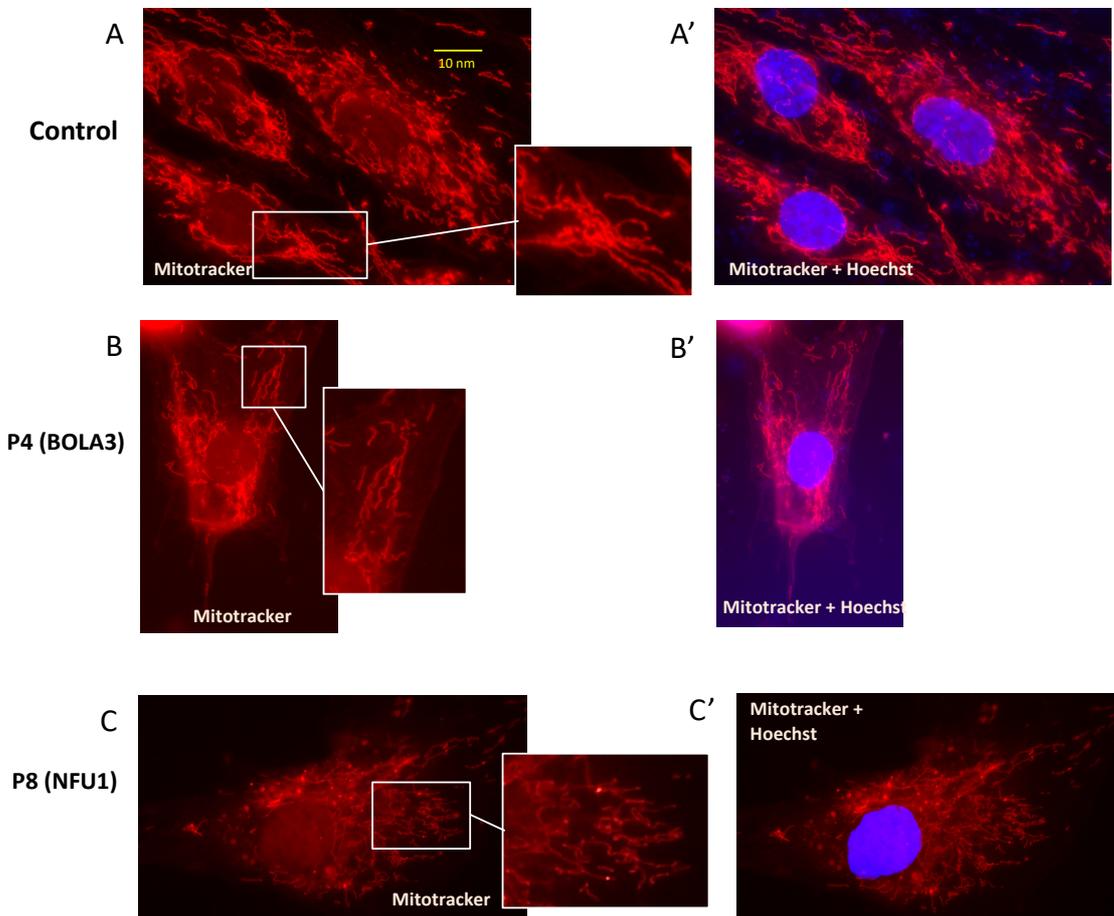
Les cellules immortalisées et non immortalisées des 2 patients P4 (BOLA3) et P8 (NFU1) et du témoin ont un profil biochimique comparable pour les activités des complexes de la CRM, de la citrate synthase (enzyme de contrôle de la quantité de mitochondries) et du complexe KGDHc (enzyme lipoylée). Le défaut d'activité des complexes I et II et de KGDHc reste présent dans les fibroblastes immortalisés des deux patients. La baisse d'activité du complexe IV identifiée dans les cellules du patient P4 (BOLA3) est également détectée. Ces résultats confirment que l'immortalisation n'annihile pas les anomalies biochimiques observées dans les fibroblastes des patients BOLA3 (P4) et NFU1 (P8). Dans les cellules du témoin, on peut observer une diminution modérée des activités enzymatiques après immortalisation. Par conséquent, dans la suite de ce travail, toutes les activités enzymatiques mesurées sur fibroblastes immortalisés de patients seront comparées à celles mesurées dans les fibroblastes immortalisés de témoins. Mes résultats confirment que la technique d'immortalisation cellulaire insérant le gène de la télomérase permet de garder le phénotype des cellules après leur transformation génétique (Robin et al. 2015). A la suite de ces résultats, une deuxième série d'immortalisation a été débutée pour les fibroblastes des patients IBA57 (P10) et ISCA2 (P12) et de deux autres témoins. L'analyse moléculaire sur l'ADN total extrait des cellules immortalisées des patients P10 (IBA57) et P12 (ISCA2) a confirmé la présence de l'anomalie génétique qui les caractérise. Pour le patient P10 (IBA57), les cellules immortalisées se divisant plus lentement que les autres cellules, l'ensemble des expérimentations envisagées n'a pu être réalisé. En conclusion, la suite de ce travail porte sur l'étude des cellules immortalisées de ces 4 patients avec déficit dans le gène *NFU1*, *BOLA3*, *IBA57* ou *ISCA2* et de témoins sauf précision contraire.

1.2.3 Le réseau mitochondrial n'est pas modifié dans les fibroblastes de patients atteints de déficit en IBA57, ISCA2, BOLA3 et NFU1

Les résultats précédents montrent que l'activité ou l'intégrité de plusieurs protéines mitochondriales de la CRM, du cycle de Krebs et de la synthèse de l'acide lipoïque sont altérées par une anomalie dans la voie de maturation des protéines Fe-S. La dynamique mitochondriale est modulée par les besoins en nutriments,

l'efficacité de la CRM ou le niveau de stress oxydatif, et l'aspect du réseau mitochondrial est un équilibre entre fusion et fission (Wai & Langer 2016). L'efficacité de la CRM étant réduite par dysfonction des complexes I, II et parfois IV chez les patients présentant un déficit en BOLA3, NFU1, IBA57 ou ISCA2, le réseau mitochondrial a donc été observé dans leurs fibroblastes par microscopie à fluorescence à l'aide du Mitotracker. Cette expérience permet d'observer l'aspect du réseau formé par les mitochondries actives au sein d'une cellule.

Les résultats obtenus dans les fibroblastes du témoin (Figure 29A) et dans les fibroblastes des patients (Figure 29B à E) sont présentés ci-dessous.



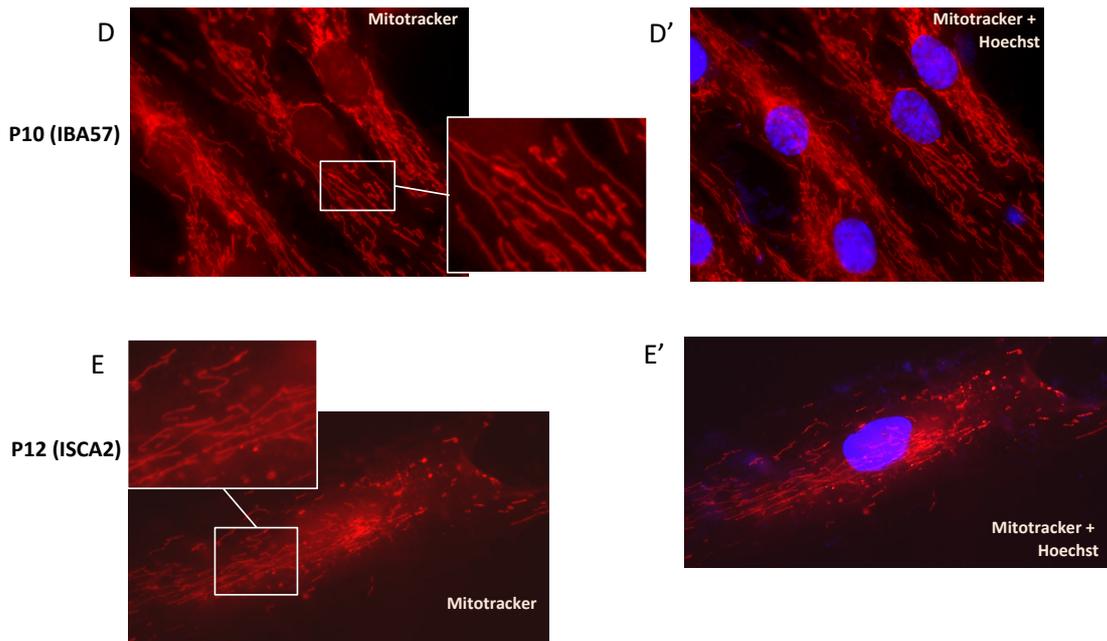


Figure 29 : Réseau mitochondrial observé par microscopie à fluorescence dans les fibroblastes des patients P4 (BOLA3), P8 (NFU1), P10 (IBA57) et P12 (ISCA2)

A à E : visualisation du réseau mitochondrial à l'aide du Mitotracker. A' à E' : visualisation du réseau mitochondrial (Mitotracker) et du noyau cellulaire (Hoechst). Fibroblastes immortalisés contrôles (A et A'); fibroblastes immortalisés du patient BOLA3 (P4) (B et B'); fibroblastes immortalisés du patient NFU1 (P8) (C et C'); fibroblastes non immortalisés du patient IBA57 (P10) (D et D'); fibroblastes immortalisés du patient ISCA2 (P12) (E et E'). Objectif x100 (1,3 NA). L'image représentée par un rectangle blanc correspond à un grossissement numérique plus important de la zone encadrée. L'échelle précisée sur la figure A est la même pour toutes les images.

Le réseau mitochondrial est d'aspect tubulaire et filamentueux dans tous les fibroblastes observés des patients P4 (BOLA3), P8 (NFU1), P10 (IBA57) et P12 (ISCA2) et du témoin, sans variation notable dans les conditions expérimentales.

Récemment, une étude dans les fibroblastes d'un patient ISCA2 a montré une anomalie de répartition du réseau mitochondrial dans la cellule par rapport à des fibroblastes contrôles avec présence de mitochondries élargies au niveau périnucléaire (Alaimo et al. 2018). Ces anomalies ont été également observées dans des myocytes de rats déficitaires en frataxine (Obis et al. 2014) et dans des cellules HeLa déplétées en ISCU, NFS1 ou HSC20 (Ferecatu et al. 2018). Un aspect fractionné du réseau mitochondrial, qui diminue les échanges de métabolites entre les mitochondries peut être mis en évidence suite au dysfonctionnement des OXPHOS (Wai & Langer 2016) ou à une anomalie de certaines protéines Fe-S incluant mitoNEET (Vernay et al. 2017). Les mitochondries élargies d'aspect particulier ne sont pas observées dans les fibroblastes des patients de mon étude,

avec un déficit en BOLA3, NFU1, ISCA2 ou IBA57, dans des conditions expérimentales similaires à celles décrites dans la littérature. Dans les fibroblastes de ces patients, seul un réseau mitochondrial tubulaire est observé, ce qui suggère que des mécanismes de compensation sont mis en place pour limiter les dysfonctionnements des OXPHOS, afin de faciliter les échanges de métabolites entre les mitochondries d'une même cellule.

1.3 Discussion

Les anomalies de la voie de biogenèse des centres Fe-S et de synthèse d'acide lipoïque entraînent des dysfonctionnements des protéines lipoylées et de la CRM (Mayr et al. 2014; Habarou et al. 2017; Alaimo et al. 2018). Le défaut de lipoylation des protéines cibles (KGDHc et PDHc) s'explique par le défaut d'activité de la protéine LIPT1, LIPT2, ou LIAS, essentielles à la synthèse d'acide lipoïque et à la lipoylation des protéines. Chez les patients déficitaires en BOLA3, IBA57, ISCA2, NFU1, du fait que ces protéines anormales ne permettent plus l'apport de centre [4Fe-4S] nécessaire à la fonctionnalité de LIAS, la synthèse de l'acide lipoïque n'est pas fonctionnelle. D'autre part, l'atteinte de la CRM est également rapportée dans ces pathologies. Le complexe II porte un centre [2Fe-2S], un centre [3Fe-4S] et [4Fe-4S] et il est toujours affecté (Cameron et al. 2011; Ajit Bolar et al. 2013; Nizon et al. 2014; Mayr et al. 2014; Alaimo et al. 2018) tandis que pour les complexes I, III et IV, l'atteinte est variable (Cameron et al. 2011; Ajit Bolar et al. 2013). Tous les patients étudiés ici présentant une anomalie dans la voie de biogenèse des centres Fe-S ont un défaut d'activité du complexe II associé à une baisse de la protéine SDHB, à l'exception de 3 patients (P7 (NFU1), P11 (ISCA2) et P13 (FDX1L)). Le déficit en complexe II s'explique par l'anomalie de maturation de la protéine SDHB qui contient un centre [4Fe-4S]. En cas de défaut d'insertion de son centre [4Fe-4S] par déficit en BOLA3, NFU1, IBA57 ou ISCA2, SDHB est instable et non fonctionnelle ce qui entraîne sa dégradation et le défaut d'intégrité du complexe II. Chez les 3 patients (P7 (NFU1), P11 (ISCA2) et P13 (FDX1L)) avec une activité du complexe II maintenue, on peut supposer que leur protéine anormale NFU1, ISCA2 ou FDX1L possède une activité résiduelle suffisante qui permet la maturation d'une protéine SDHB normale.

Le déficit en complexe I a été décrit précédemment chez un patient FDX1L (Spiegel et al. 2014), des patients IBA57 (Ajit Bolar et al. 2013; Torraco et al. 2017), et des patients NFU1 et BOLA3 (Cameron et al. 2011; Ahting et al. 2015). A l'inverse, l'activité du complexe I chez un patient ISCA2 était normale (Alaimo et al. 2018). Les 13 patients de mon étude présentent également un défaut d'activité du complexe I en accord avec les résultats de la littérature, à l'exception des patients déficitaires en ISCA2. Les patients ISCA2 inclus dans notre étude portent des mutations différentes de celui rapporté par (Alaimo et al. 2018), ce qui peut expliquer la différence d'impact du déficit sur le complexe I. Le déficit en complexe I chez l'ensemble des patients est probablement causé par le défaut de maturation des 5 protéines Fe-S qui le composent, suite aux anomalies de la voie de biogenèse des centres Fe-S. Comme discuté dans l'article ci-dessus (paragraphe 1.1), cette hypothèse n'élucide pas le déficit du complexe I mis en évidence chez les patients LIPT1 (P1) et LIPT2 (P2) qui possèdent une anomalie dans la voie de lipoylation des protéines. Pour ces patients, le défaut d'acide lipoïque pourrait induire une diminution de la synthèse mitochondriale de protéines en réduisant l'efficacité de la RNase P qui active l'ARNt de la proline, nécessaire à l'expression des protéines mitochondriales (Hiltunen et al. 2009; Melber et al. 2016). Cette hypothèse pourrait expliquer également les anomalies concernant le complexe IV qui peut avoir une activité diminuée ou une atteinte de son intégrité dans les déficits de la biogenèse des centres Fe-S ou le déficit en LIPT2. Cependant, le complexe III, qui possède également une sous-unité codée par le génome mitochondrial, n'est atteint chez aucun des patients étudiés. En conclusion, il paraît peu probable que la synthèse protéique mitochondriale soit diminuée suite au défaut quantitatif d'acide lipoïque.

Au sein du complexe III, seule la protéine Rieske est une protéine Fe-S et l'assemblage du complexe III requiert l'insertion du centre [2Fe-2S] dans la protéine Rieske (Fernandez-V et al. 2018). Les patients étudiés ici ne présentent pas de déficit quantitatif de la protéine Rieske ni de défaut d'intégrité du complexe III suggérant que l'insertion du centre [2Fe-2S] est conservée dans les anomalies en BOLA3, NFU1, IBA57 et ISCA2. Une autre protéine mitochondriale à centre [2Fe-2S] est la ferrocélatase, impliquée dans la synthèse de l'hème. Dans les fibroblastes des patients étudiés, elle est en quantité comparable à celle évaluée dans les cellules contrôles. Ces résultats confirment que les déficits en BOLA3, NFU1, IBA57

et ISCA2 n'entraînent pas de dysfonctionnement des protéines [2Fe-2S] et que ces protéines seraient dédiées à la maturation des protéines [4Fe-4S].

Récemment, une modification de l'aspect du réseau mitochondrial a été mise en évidence dans les fibroblastes chez un patient ISCA2 (Alaimo et al. 2018). Les auteurs observent une distribution périnucléaire anormale du réseau mitochondrial, associée à une diminution de la quantité d'ADNmt. Chez mes 4 patients ayant un déficit en BOLA3, NFU1, IBA57 et ISCA2, le réseau mitochondrial observé dans leurs fibroblastes présente un aspect filamenteux, comparable à celui des cellules témoins sans retrouver cette distribution périnucléaire anormale. Le patient déficitaire en ISCA2 rapporté par (Alaimo et al. 2018) porte la mutation p.Gly77Ser décrite chez la plupart des patients ISCA2 de la littérature alors que le patient ISCA2 (P12) est porteur d'une autre mutation (p.Arg105Gly). Il serait intéressant d'étudier si l'anomalie du réseau mitochondrial et la diminution quantitative de l'ADNmt sont retrouvées chez les autres patients ISCA2 avec la mutation p.Gly77Ser.

2 Etude de l'effet d'une supplémentation en acide lipoïque sur les fibroblastes immortalisés de patients déficitaires en BOLA3, NFU1, IBA57 ou ISCA2

Les patients étudiés ayant tous un défaut de lipoylation des complexes PDHc et KGDHc par défaut de biogenèse des centres Fe-S, il est intéressant d'évaluer si l'apport exogène d'acide lipoïque sur les cellules peut avoir un effet sur la restauration de la fonctionnalité des enzymes lipoylées et sur celle des complexes de la CRM. Dans une seconde partie, j'ai donc expérimenté l'effet d'une supplémentation en acide lipoïque dans le milieu de culture des fibroblastes immortalisés des patients et de témoins pendant 3 semaines minimum avec une solution d'acide lipoïque (2 mg/L et 20 mg/L). J'ai ensuite mesuré l'activité des complexes de la CRM et de certaines enzymes du cycle de Krebs. Notre patient P8 avait fait l'objet d'une expérimentation similaire par l'équipe de (Nizon et al. 2014), et l'étude avait mis en évidence une restauration de l'activité du complexe IV en présence d'acide lipoïque bien que les autres activités enzymatiques (PDHc, complexe II) n'étaient pas restaurées. Ces résultats suggèrent alors que l'acide

lipoïque peut avoir un effet favorable sur l'activité de certains complexes de la CRM pour un patient avec un déficit en NFU1. Cet effet a aussi été décrit *in vivo* chez le rat âgé présentant une diminution de l'activité des complexes de la CRM (Arivazhagan et al. 2001). L'objectif de mon étude est de voir si un tel effet peut être observé pour les sujets avec déficit en BOLA3, IBA57 ou ISCA2, et sur d'autres activités enzymatiques que celles déjà étudiées pour le patient NFU1 (complexe I, KGDHc). Le patient P10 (IBA57) n'a pu être inclus dans cette expérimentation à cause de la faible vitesse de division de ses fibroblastes (voir p.94).

Une autre conséquence possible du déficit en acide lipoïque, qui est un antioxydant majeur, est que le niveau de stress oxydatif soit augmenté secondairement à ce déficit. J'ai donc étudié le niveau de stress oxydatif dans les fibroblastes des patients. Dans un premier temps, j'avais dosé le glutathion réduit (GSH) dans les fibroblastes des patients P1 à P13. Aucune variation de concentration de GSH n'a été mise en évidence par rapport à celle mesurée dans des fibroblastes contrôles (résultats présentés dans l'article, p.91). Pour confirmer ces résultats, deux autres marqueurs de stress oxydatif détectables dans les fibroblastes ont été mesurés : les sulfoperoxyrédoxines, marqueurs réversibles et précoces du stress oxydatif, issues de la sulfonylation des peroxyrédoxines à 2 cystéines, et le malondialdéhyde (MDA) marqueur irréversible et tardif du stress oxydatif puisqu'il s'agit d'une empreinte de la peroxydation lipidique. Le MDA a aussi été dosé dans les fibroblastes supplémentés en acide lipoïque car une concentration trop élevée d'acide lipoïque pouvait induire un effet prooxydant (Packer et al. 1995).

2.1 La supplémentation en acide lipoïque ne restaure pas les activités des complexes I, II et IV de la CRM ni de KGDHc

Les activités enzymatiques des complexes enzymatiques de la CRM, du complexe KGDHc et de la citrate synthase ont été mesurées dans des fractions enrichies en mitochondries de fibroblastes immortalisés des patients P4 (BOLA3), P8 (NFU1) et P12 (ISCA2) et de 3 témoins, cultivés avec les différentes concentrations d'acide lipoïque dans le milieu de culture (0,2 mg/L pour le milieu de base, 2 mg/L ou 20 mg/L pour le milieu supplémenté). Pour évaluer l'effet d'une supplémentation en

acide lipoïque sur l'activité d'une protéine lipoylée, la mesure du complexe KGDHc a été retenue.

- **Activités enzymatiques des complexes de la CRM et d'enzymes du cycle de Krebs des fibroblastes témoins**

Les résultats des activités enzymatiques mesurées selon les différentes conditions de culture dans les cellules témoins sont présentés dans la Figure 30. L'activité de la citrate synthase reflète la quantité de mitochondries et sert d'enzyme de contrôle pour chaque échantillon.

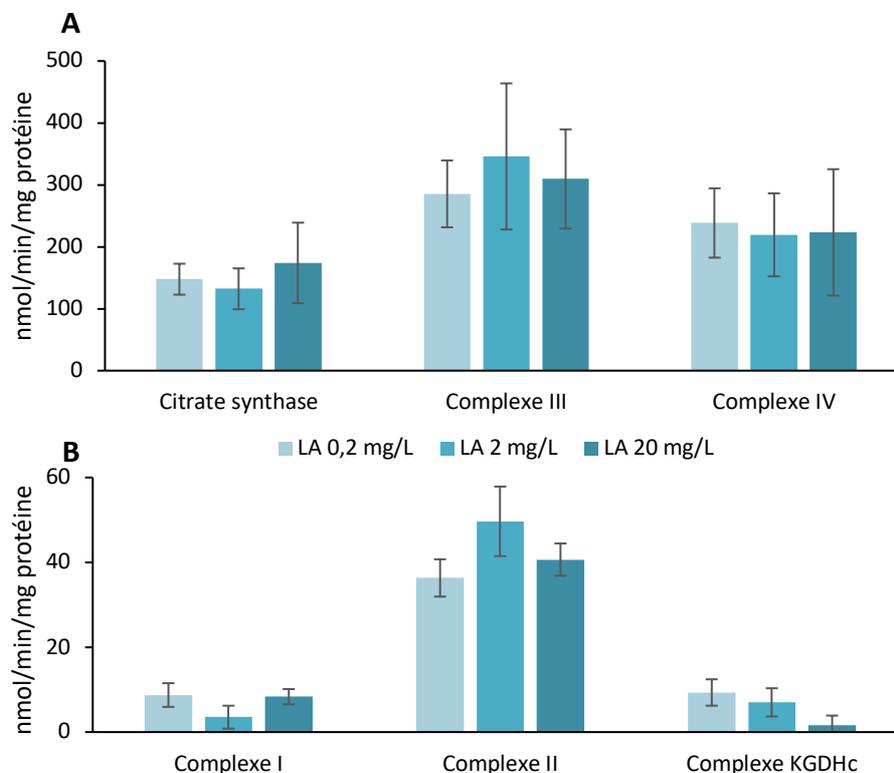


Figure 30 : Activités enzymatiques des complexes de la CRM et d'enzymes du cycle de Krebs dans les fibroblastes témoins supplémentés en acide lipoïque.

Les activités de la citrate synthase (enzyme de contrôle), des complexes III et IV (A), des complexes I et II de la CRM et de KGDHc (B) ont été mesurées dans des fractions enrichies en mitochondries des fibroblastes immortalisés contrôles (n=3) cultivés avec 0,2 mg/L (état basal, bleu clair), 2 mg/L (turquoise) et 20 mg/L (turquoise foncé) d'acide lipoïque (LA). Les résultats sont la moyenne des expérimentations pour les 3 contrôles (une ou deux expérimentations pour chaque contrôle). Les barres d'erreur représentent l'écart-type.

Les activités enzymatiques mesurées dans les fibroblastes témoins ne montrent pas de différence évidente selon les différentes concentrations d'acide lipoïque dans

le milieu de culture, à l'exception de l'activité du complexe KGDHc qui diminue avec l'apport d'acide lipoïque à 20 mg/L.

- **Activités enzymatiques des complexes de la CRM et d'enzymes du cycle de Krebs du patient BOLA3 (P4)**

Les activités enzymatiques mesurées dans les fibroblastes du patient BOLA3 (P4), supplémentés ou non en acide lipoïque, sont représentées rapportées à celles des fibroblastes témoins (Figure 31).

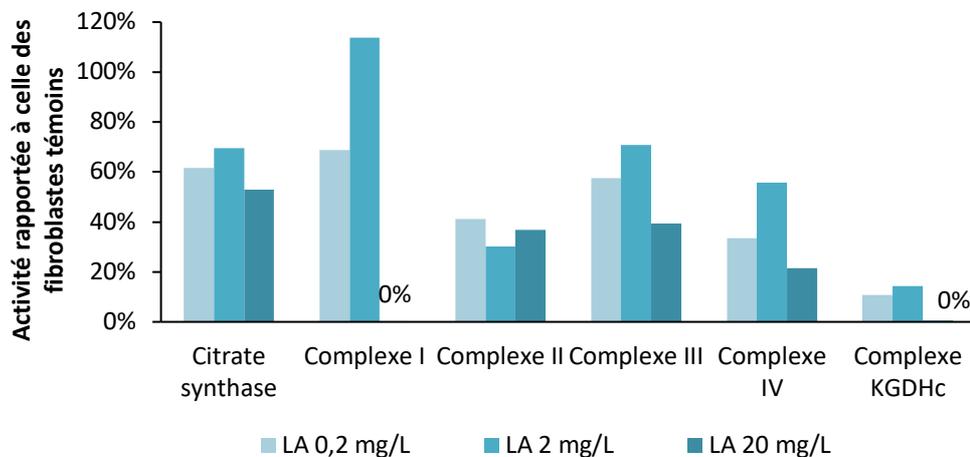


Figure 31 : Activités enzymatiques des complexes de la CRM et d'enzymes du cycle de Krebs dans les fibroblastes du patient BOLA3 supplémentés en acide lipoïque.

Les activités ont été mesurées dans des fractions enrichies en mitochondries des fibroblastes immortalisés du patient BOLA3 (P4) cultivés avec 0,2 mg/L (état basal, bleu clair), 2 mg/L (turquoise) et 20 mg/L (turquoise foncé) d'acide lipoïque (LA). Les activités sont rapportées en % de la moyenne des activités mesurées dans les fibroblastes témoins (n=3) dans les mêmes conditions. Chaque barre représente une mesure. Les activités relatives <2% (notées sur les barres) ont été vérifiées par une seconde mesure sur le même échantillon.

L'étude des fibroblastes immortalisés du patient BOLA3 avec les 3 concentrations d'acide lipoïque montre que l'activité relative de la citrate synthase est stable ce qui témoigne d'une quantité de mitochondries équivalente dans les différents échantillons. L'activité relative du complexe I augmente en présence de 2 mg/L d'acide lipoïque, mais reste basse en valeur absolue (Annexe 1) voire indétectable avec 20 mg/L d'acide lipoïque dans le milieu de culture. L'activité relative du complexe II reste basse avec les 3 conditions testées, sans restauration d'une activité normale. Pour les complexes III et IV de la CRM, leur activité a tendance à

diminuer en présence de 20 mg/L d'acide lipoïque. L'activité du complexe KGDHc, enzyme lipoylée, n'est pas restaurée après supplémentation en acide lipoïque.

- **Activités enzymatiques des complexes de la CRM et d'enzymes du cycle de Krebs du patient NFU1 (P8)**

Les résultats des mesures d'activités enzymatiques des complexes de la CRM, de la citrate synthase et de KGDHc dans les fibroblastes immortalisés du patient NFU1 supplémentés ou non en acide lipoïque sont présentés rapportés aux activités mesurées dans les fibroblastes témoins (Figure 32).

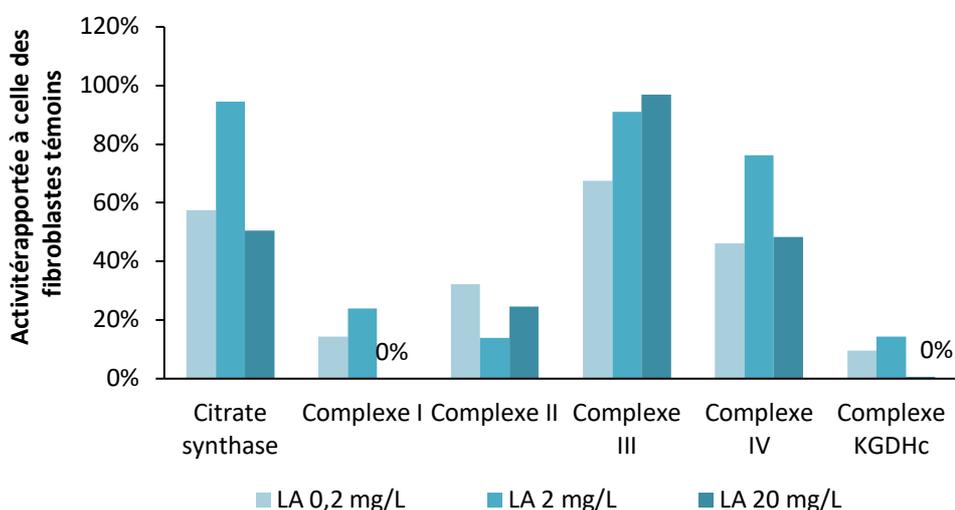


Figure 32 : Activités enzymatiques des complexes de la CRM et d'enzymes du cycle de Krebs dans les fibroblastes du patient NFU1 supplémentés en acide lipoïque.

Les activités ont été mesurées dans des fractions enrichies en mitochondries des fibroblastes immortalisés du patient P8 (NFU1) cultivés avec 0,2 mg/L (état basal, bleu clair), 2 mg/L (turquoise) et 20 mg/L (turquoise foncé) d'acide lipoïque (LA). Les activités sont rapportées en % de la moyenne des activités mesurées dans les fibroblastes témoins (n=3) dans les mêmes conditions. Chaque barre représente une mesure. Les activités relatives <2% (notées sur les barres) ont été vérifiées par une seconde mesure sur le même échantillon.

La citrate synthase augmente en présence de 2 mg/L d'acide lipoïque, reflétant une quantité de mitochondries plus importante sur cet échantillon. Cette variation peut être due à un effet de l'acide lipoïque ou au meilleur rendement de l'enrichissement en mitochondries. Les activités des complexes I, II et de KGDHc restent très diminuées par rapport à celles des contrôles. En présence de 20 mg/L d'acide lipoïque dans le milieu de culture, les activités du complexe I et de KGDHc sont même indétectables. L'activité du complexe III augmente en présence d'acide

lipoïque (2 mg/L ou 20 mg/L). L'activité du complexe IV avec 2 mg/L d'acide lipoïque augmente de pair avec l'activité de la citrate synthase, ce qui ne permet pas de conclure à un effet stimulateur de l'acide lipoïque sur l'activité du complexe IV.

- **Activités enzymatiques des complexes de la CRM et d'enzymes du cycle de Krebs du patient ISCA2 (P12)**

La même étude a été effectuée dans les fibroblastes du patient ISCA2 (P12) et les activités mesurées sont présentées rapportées aux activités mesurées dans les fibroblastes des témoins pour chaque condition expérimentale (Figure 33).

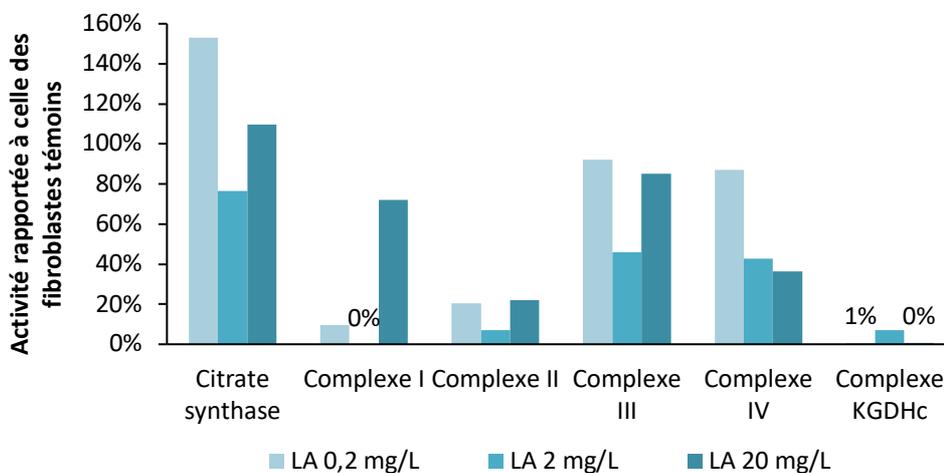


Figure 33 : Activités enzymatiques complexes de la CRM et d'enzymes du cycle de Krebs dans les fibroblastes du patient ISCA2 supplémentés en acide lipoïque.

Les activités ont été mesurées dans des fractions enrichies en mitochondries des fibroblastes immortalisés du patient ISCA2 (P12) cultivés avec 0,2 mg/L (état basal, bleu clair), 2 mg/L (turquoise) et 20 mg/L (turquoise foncé) d'acide lipoïque (LA). Les activités sont rapportées en % de la moyenne des activités mesurées dans les fibroblastes témoins (n=3) dans les mêmes conditions. Chaque barre représente une mesure. Les activités relatives <2% (notées sur les barres) ont été vérifiées par une seconde mesure sur le même échantillon.

L'activité de la citrate synthase dans les fibroblastes du patient ISCA2 supplémentés en acide lipoïque reflète une quantité de mitochondries variable dans les 3 échantillons. L'activité du complexe I, très diminuée en condition basale, est augmentée après supplémentation en acide lipoïque à 20 mg/L. Les activités du complexe II et de KGDHc restent très faibles voire indétectables avant ou après ajout d'acide lipoïque dans le milieu de culture. L'activité du complexe III varie concomitamment avec la quantité de mitochondries, donc elle n'est pas modifiée par

l'ajout d'acide lipoïque. L'activité du complexe IV varie également concomitamment avec la quantité de mitochondries après supplémentation des cellules avec 2 mg/L par contre elle diminue fortement en présence d'acide lipoïque à 20 mg/L.

Ces résultats montrent que la supplémentation en acide lipoïque dans le milieu de culture des fibroblastes n'a pas d'effet majeur sur l'activité des complexes de la chaîne respiratoire dans les fibroblastes ni des témoins ni des patients avec un effet plutôt délétère sur l'activité de KGDHc à forte concentration. L'activité du complexe KGDHc n'a pas donc pas été restaurée dans les cellules de patients supplémentées en acide lipoïque. Ce résultat est en accord avec les résultats obtenus pour le complexe PDHc, dont l'activité n'était pas modifiée après supplémentation en acide lipoïque des fibroblastes du patient NFU1 (P8) (Nizon et al. 2014). L'acide lipoïque exogène ne parvient probablement pas à intégrer la sous-unité lipoylée de ces complexes enzymatiques mitochondriaux.

Les activités des complexes I et II, très diminuées dans les fibroblastes des 3 patients, ne sont pas non plus restaurées par l'ajout d'acide lipoïque, sauf dans les cellules du patient P12 (ISCA2) dans lesquelles l'activité du complexe I semble améliorée en présence de 20 mg/L d'acide lipoïque. Concernant le complexe IV, la première étude chez le patient NFU1 (Nizon et al. 2014) a mis en évidence une augmentation de l'activité du complexe IV après supplémentation *in cellulo* en acide lipoïque, avec augmentation du ratio activité du complexe IV/activité de la citrate synthase (ratio à 1, 2 et 2,5 pour les concentrations d'acide lipoïque respectives de 0,2, 2 et 20 mg/L). Mes expérimentations, réalisées sur fractions enrichies en mitochondries des fibroblastes de ce même patient, ont retrouvé un ratio proche de 1 quelle que soit la concentration d'acide lipoïque *in cellulo* (Annexe 1). A l'inverse, l'acide lipoïque pourrait avoir un effet délétère sur le complexe IV, dans les fibroblastes du patient ISCA2 après supplémentation avec 20 mg/L d'acide lipoïque. Une étude sur les hépatocytes de rats, supplémentés en acide lipoïque *in vitro* pendant une durée de 30 min à 1h (Valdecantos et al. 2010), a montré que l'acide lipoïque entraînait une diminution de la consommation en O₂ par la mitochondrie, soit un effet plutôt délétère sur l'activité des complexes de la CRM. Il serait intéressant de compléter les expérimentations *in vitro* sur les cellules d'autres patients présentant une anomalie dans la voie de maturation des protéines Fe-S pour mieux évaluer

l'effet induit par l'acide lipoïque sur les activités des complexes de la CRM notamment les complexes I et IV.

Les complexes I et IV sont donc les deux complexes de la CRM sur lesquels l'acide lipoïque pourrait avoir un effet stimulant ou, au contraire, inhibiteur dans les fibroblastes de certains patients. L'acide lipoïque semble aussi affecter l'activité du complexe KGDHc sur les cellules contrôles. Ces 3 complexes enzymatiques, complexe I, complexe IV et KGDHc, sont les principaux sites de production de ROS dans la mitochondrie. Lorsque la CRM est moins efficace, comme c'est le cas chez ces patients, elle est dans un état oxydé ce qui augmente la production de ROS au niveau des complexes I, III et IV (Nickel et al. 2014). L'acide lipoïque étant un antioxydant majeur, une variation de sa concentration mitochondriale ou cellulaire peut influencer sur l'homéostasie rédox. Il est donc possible que les effets observés au niveau de l'activité de KGDHc dans mes expérimentations soient liés à une variation du stress oxydatif dans la cellule après supplémentation en acide lipoïque. Dans les mitochondries de mammifères, l'acide lipoïque semble majoritairement sous forme réduite et peut induire la formation d'anion superoxyde (Rochette et al. 2013). J'ai donc étudié le stress oxydatif dans les fibroblastes des patients supplémentés ou non avec de l'acide lipoïque. Les objectifs sont d'évaluer l'existence d'un stress oxydatif détectable dans les fibroblastes, suite au dysfonctionnement de la CRM et d'évaluer également l'effet de l'apport exogène d'acide lipoïque sur le niveau de stress oxydatif.

2.2 Le niveau de stress oxydatif n'est pas augmenté dans les fibroblastes des patients

Pour étudier le stress oxydatif dans les cellules des patients, deux marqueurs mesurables dans les fibroblastes ont été utilisés, les sulfoperoxyrédoxines (Prx-SOx) et le malondialdéhyde (MDA). Les peroxyrédoxines sont des enzymes du métabolisme rédox qui contiennent plusieurs résidus cystéine et qui permettent de détoxifier l' H_2O_2 dans les cellules. Les peroxyrédoxines I à IV contiennent 2 résidus cystéine dans leur site actif, elles sont nommées Prx-2Cys. En présence de H_2O_2 , ces résidus cystéine sont oxydés en groupement sulfinyl $-C-SO_2$ puis sulfonyl $-C-SO_3$. Ces Prx-SOx forment une sous-population des Prx-2Cys et participent

physiologiquement à la signalisation rédox cellulaire mais, lorsqu'elles sont en excès, elles représentent, de manière précoce, un marqueur de stress oxydatif (Rhee 2016). Ce marqueur est réversible car, lorsque le stress oxydatif diminue, le groupement sulfonyl est réduit en thiol par les sulfirédoxines (Jeong et al. 2012) (Figure 34).

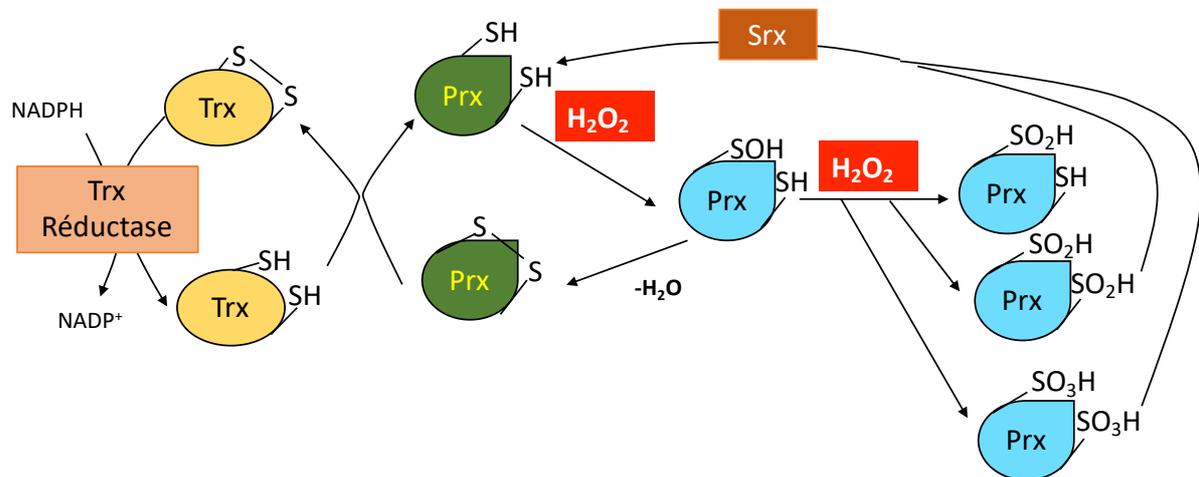


Figure 34 : Formation des Prx-SOx à partir de Prx-2Cys en présence d' H_2O_2 et voie de réduction des Prx-SOx.

Les Prx-SOx (en bleu) sous forme sulfinylée SO_2H ou sulfonylée SO_3H peuvent être réduites en Prx-2Cys (en vert) par les sulfirédoxines (Srx). Les Prx-2Cys oxydées sont réduites par action de la thiorédoxine (Trx) réductase NADPH dépendante. Adapté d'après (Jeong et al. 2012; Abbas et al. 2013).

Un autre marqueur de stress oxydatif est le MDA. Ce dernier est une empreinte de la peroxydation lipidique. Il est issu de la réaction entre des radicaux libres de type OH^\cdot et les lipides membranaires (Michel et al. 2008). Le MDA constitue un marqueur irréversible d'un stress oxydatif et peut être mesuré dans les tissus ou les liquides biologiques.

- **Prx-SOx**

Les Prx-SOx ont été recherchées dans les fibroblastes des patients P4 (BOLA3) et P8 (NFU1) à l'état basal, c'est-à-dire non supplémentés en acide lipoïque. Tous deux présentent un défaut d'activité du complexe I mais seul le patient P4 (BOLA3) a une activité du complexe IV diminuée. Les résultats de l'immunoblot recherchant les Prx-SOx sont présentés sur la Figure 35.

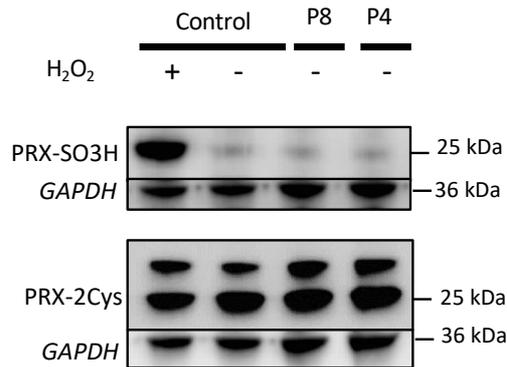


Figure 35 : Détection des Prx-SO₃ et des Prx-2Cys dans les fibroblastes des patients P4 (BOLA3) et P8 (NFU1)

La quantité totale de Prx-2Cys est détectée à l'aide d'un anticorps reconnaissant ce type de peroxyrédoxines (bas) et les Prx-SO₃, sous-population de Prx-2Cys, ont été détectées à l'aide d'un anticorps spécifique (haut). La formation de Prx-SO₃ est obtenue après incubation de fibroblastes contrôles avec H₂O₂. Les échantillons sont des homogénats de fibroblastes non immortalisés. La GAPDH sert de contrôle de charge des échantillons.

Les Prx-2Cys sont détectables en quantité équivalente dans les fibroblastes des témoins et des patients. Les Prx-SO₃ sont faiblement détectables dans les cellules des patients en quantité similaire à celle dans les cellules du contrôle négatif et il n'y a pas d'augmentation des Prx-SO₃ entre les fibroblastes des deux patients P4 (BOLA3) et P8 (NFU1). Les Prx-SOx ne permettent pas d'expliquer les différences de résultats de l'activité enzymatique du complexe IV entre ces deux patients. Suite à ces résultats, les Prx-SOx n'ont pas été recherchées dans les fibroblastes d'autres patients.

- **MDA**

L'objectif du dosage de MDA (méthode des TBARs) est d'évaluer s'il existe un stress oxydatif qui aurait conduit à une augmentation de la peroxydation lipidique, dans les cellules de patients versus témoins, supplémentées ou non en acide lipoïque. J'ai donc mesuré la quantité de MDA dans les fibroblastes immortalisés des 4 patients P4 (BOLA3), P8 (NFU1), P10 (IBA57), P12 (ISCA2) et de témoins (n=3), cultivés avec 2 mg/L et 20 mg/L d'acide lipoïque ou de l'éthanol (véhicule de l'acide lipoïque dans le milieu de culture). Les résultats du dosage du MDA dans les cellules cultivées avec 20 mg/L d'acide lipoïque ont été exclus de l'étude car non disponibles pour tous les échantillons. Les résultats obtenus sont présentés sur la Figure 36.

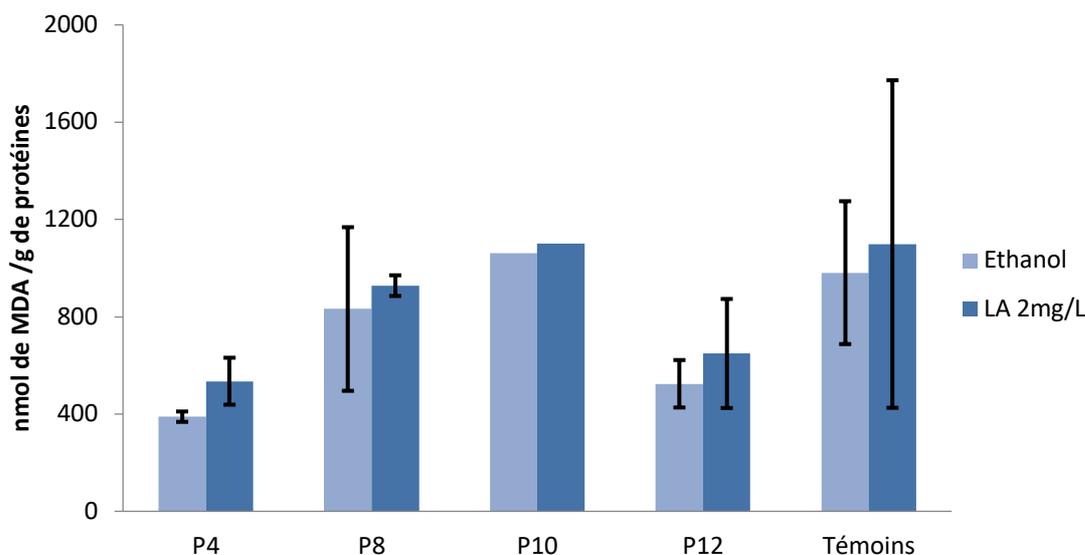


Figure 36 : Quantité de MDA détectée dans les fibroblastes des patients déficitaires en BOLA3 (P4), NFU1 (P8), IBA57 (P10), ISCA2 (P12)

Le MDA est quantifié par la méthode des TBARs dans des fibroblastes immortalisés cultivés avec 2 mg/L d'acide lipoïque (LA, bleu foncé) ou de l'éthanol, véhicule de l'acide lipoïque (bleu clair). Chaque expérimentation est la moyenne d'un dosage fait en double. Pour les patients, à l'exception du patient P10 pour lequel une seule expérimentation a été réalisée, 2 expérimentations indépendantes ont été réalisées dans chaque condition. Pour les témoins, les résultats sont la moyenne de deux expérimentations chez 3 contrôles différents. La barre d'erreur représente l'écart-type entre les expérimentations.

Les expérimentations étant la moyenne de deux mesures dans les fibroblastes des patients P4 (BOLA3), P8 (NFU1) et P12 (ISCA2) ou bien le résultat d'une seule mesure (P10, IBA57), ces résultats sont à interpréter avec précaution. Les résultats montrent que la quantité de MDA dans les cellules témoins avec ou sans acide lipoïque varie peu. Dans les fibroblastes des 4 patients, supplémentés ou non en acide lipoïque, le MDA est en quantité stable et les valeurs retrouvées restent proches voire en deçà de celles mises en évidence dans les cellules des témoins.

Les résultats de ces deux études mettent en évidence l'absence de détection de Prx-SOx dans les fibroblastes des patients P4 (BOLA3) et P8 (NFU1) et une quantité de MDA équivalente entre les fibroblastes de patients et des témoins, avec ou sans ajout d'acide lipoïque. Les quantités de MDA mesurées sont également proches de celles retrouvées dans les fibroblastes en conditions de culture standard (Laurent et al. 2013). Cela suggère que le niveau de peroxydation lipidique dans les cellules des

patients n'est pas affecté ni par le déficit mitochondrial en acide lipoïque ni par l'apport exogène d'acide lipoïque dans le milieu de culture. De plus, la concentration de GSH mesurée dans les fibroblastes des 13 patients, en conditions de culture basales, était également inchangée par rapport aux cellules contrôles (résultats p.91). Les résultats de l'étude de ces 3 marqueurs de stress oxydatif sont concordants et laissent penser que le stress oxydatif n'est pas plus important dans les fibroblastes de patients que dans les cellules témoins. Ils suggèrent que les anomalies de la biogenèse des centres Fe-S notamment les déficits en NFU1, BOLA3, IBA57 et ISCA2 n'induisent pas d'augmentation majeure du stress oxydatif dans les fibroblastes, malgré le déficit en acide lipoïque.

2.3 Discussion

Les quatre patients BOLA3 (P4), NFU1 (P8), IBA57 (P10), ISCA2 (P12) ont une mutation dans un gène codant une protéine de la voie de biogenèse des centres Fe-S, qui mène à une altération de la synthèse de l'acide lipoïque par défaut de maturation de la protéine LIAS. Par conséquent, ces anomalies entraînent un déficit d'activité des enzymes ayant comme cofacteur l'acide lipoïque (PDHc, KGDHc) mais aussi une diminution de l'activité de certains complexes de la CRM, par défaut de maturation de protéines à centre [4Fe-4S] qui les composent (complexe I, complexe II), et aussi, de façon plus surprenante, du complexe IV, qui n'est constitué ni de protéines lipoylées ni de protéines Fe-S. Le complexe III, porteur de la sous-unité Rieske à centre [2Fe-2S] n'est pas affecté. Les anomalies de l'intégrité et de l'activité du complexe IV observées chez la plupart des patients ne peuvent donc pas être expliquées par le simple défaut de maturation des protéines Fe-S. Précédemment, le déficit en complexe IV avait été rapporté chez certains patients IBA57 (Torraco et al. 2017), un patient BOLA3 (Nishioka et al. 2018) et quelques patients NFU1 (Cameron et al. 2011; Ahting et al. 2015) sans que le mécanisme ne soit élucidé. J'ai exploré l'hypothèse que le déficit en complexe IV soit lié à une augmentation du stress oxydatif, dans les fibroblastes des patients, sachant que l'acide lipoïque est un antioxydant et que sa synthèse est altérée dans ces cellules. L'étude de trois marqueurs de stress oxydatif ne conforte pas cette hypothèse, bien que les résultats aient été obtenus sur peu de données et soient préliminaires.

J'ai ensuite étudié si une supplémentation en acide lipoïque des fibroblastes de patients pouvait améliorer les conséquences biochimiques de ces déficits. *In cellulo*, l'apport exogène d'acide lipoïque dans les fibroblastes immortalisés de 3 patients BOLA3, ISCA2 et NFU1 n'a pas eu d'effet notable. En effet, il n'y a pas eu de restauration des activités déficitaires des complexes I, II et IV et de KGDHc. Une expérimentation similaire avait été réalisée dans les fibroblastes du même patient NFU1 (Nizon et al. 2014) (P8 inclus dans notre étude) sans effet sur l'activité du complexe PDHc et des complexes de la CRM, à l'exception du complexe IV qui avait une activité augmentée après supplémentation en acide lipoïque (2 mg/L et 20 mg/L). D'autre part, il a été montré que l'apport exogène d'acide lipoïque *in vivo* peut stimuler l'activité des complexes I, II et IV de la CRM et du complexe KGDHc chez des rats, et diminuer également la peroxydation lipidique (Arivazhagan et al. 2001). Cependant, une autre étude a expérimenté l'effet d'une supplémentation mitochondriale en acide lipoïque *in vitro* pendant 30 à 60 minutes et les résultats ont montré un plus fort ralentissement de l'activité de la CRM dans ces conditions par rapport à d'autres antioxydants (Valdecantos et al. 2010). *In vivo*, l'apport d'acide lipoïque chez le patient P8 n'a pas entraîné une amélioration de son état clinique (Nizon et al. 2014). Ce résultat peut être expliqué par le fait que l'acide lipoïque exogène ne parvienne pas à traverser la barrière hémato-encéphalique (Chng et al. 2009). L'ensemble de ces données montrent que la supplémentation en acide lipoïque peut avoir des effets variables et demande d'autres expérimentations approfondies pour comprendre quel effet l'acide lipoïque peut avoir sur l'activité de la CRM et si d'autres antioxydants peuvent stimuler celle-ci chez des patients atteints d'anomalies de la biogenèse des centres Fe-S.

L'étude de Valdecantos et al. de 2010 a montré que l'acide lipoïque, pouvait avoir un effet prooxydant, en diminuant l'activité enzymatique mitochondriale de la glutathion peroxydase (GPX), enzyme qui catalyse la régénération du GSH oxydé (GSSG), ce qui pourrait entraîner une diminution du ratio GSH/GSSG. Lorsque j'ai évalué le niveau basal de stress oxydatif dans les cellules des patients P1 à P13, je n'ai pas mis en évidence de variation de la concentration du GSH réduit. Cependant, ce dosage a été réalisé sur extraits cellulaires totaux et non pas sur extraits mitochondriaux. En effet, le dosage du GSH réalisé sur les fractions mitochondriales n'a pas permis d'obtenir des résultats exploitables. Dans les systèmes biologiques, le

couple rédox acide lipoïque/dihydro-acide lipoïque (LA/DHLA) a un effet antioxydant en participant à la réduction du GSSG en GSH (Rochette et al. 2013). Les fibroblastes sont des cellules où la concentration en GSSG est difficilement détectable, et ne sont pas un tissu favorable pour étudier le ratio GSH/GSSG. Il pourrait être intéressant de l'évaluer dans d'autres tissus, plus riches en mitochondries tels que le cerveau, issu de modèles animaux déficitaires dans la voie de la biogenèse des centres Fe-S, avant et après supplémentation en acide lipoïque, pour cibler l'impact du déficit en acide lipoïque et la place du stress oxydatif sur la physiopathologie de l'encéphalopathie sévère qui caractérise ces pathologies chez l'Homme.

Le fait de ne pas observer d'effet de l'acide lipoïque ni sur le stress oxydatif ni sur l'amélioration des activités enzymatiques de KGDHc m'a également amenée à m'interroger sur la capacité que possède l'acide lipoïque exogène à intégrer la mitochondrie. Le transport de l'acide lipoïque à travers la membrane cellulaire requiert différents systèmes tels que le transporteur des acides gras à chaîne moyenne ou le transporteur de vitamines sodium-dépendant (Packer & Cadenas 2010) mais le mécanisme d'import dans la mitochondrie n'est pas connu. Lorsque des mitochondries isolées sont incubées avec de l'acide lipoïque une faible quantité de ce dernier est détectable dans la mitochondrie (Tirosh et al. 2003), suggérant qu'un import mitochondrial est possible. Peu de données sont disponibles sur la concentration de l'acide lipoïque dans la mitochondrie, qui est très majoritairement lié aux sous-unités E2 des céto-acide déshydrogénases (Packer & Cadenas 2010) et le dosage de l'acide lipoïque libre, c'est-à-dire non lié aux protéines, est difficilement accessible (technique de chromatographie liquide haute performance en phase inverse couplée à une détection électrochimique) et limité à certains tissus ou liquides biologiques (Khan et al. 2011). Les nombreuses propriétés associées à l'acide lipoïque utilisé en thérapeutique sont notamment liées à ses capacités antioxydantes indirectes, en activant le facteur de transcription comme Nrf2, ce qui entraîne l'augmentation de la synthèse du GSH (Suh et al. 2004; Shi et al. 2016), et à ses propriétés dans la transduction de signaux pour diminuer l'intolérance au glucose dans le diabète et l'obésité (Shay et al. 2009). Ces voies de signalisation sont cytosoliques et liées à la concentration d'acide lipoïque libre, dans le cytosol. Les voies métaboliques de l'acide lipoïque libre dans la mitochondrie, c'est-à-dire

non lié aux protéines, ne sont pas identifiées à ce jour. Leur étude pourrait permettre de mieux caractériser les conséquences du défaut d'acide lipoïque chez les patients atteints de MMDS ou de déficit dans la voie de synthèse de l'acide lipoïque.

3 Exploration des anomalies mitochondriales chez un patient déficitaire en ISCA1

Pendant la réalisation de ce travail, j'ai mis en évidence chez un nouveau patient un variant homozygote dans le gène *ISCA1* codant pour la protéine ISCA1 impliquée dans la biogenèse des centres Fe-S. Au moment où l'anomalie a été identifiée dans notre service, à la fin de l'année 2016, aucun déficit dans la protéine ISCA1 n'était encore décrit dans la littérature. J'ai donc décidé d'étudier l'effet du déficit en ISCA1 sur le fonctionnement de la CRM et sur d'autres protéines mitochondriales. L'objectif est, d'une part, de confirmer la pathogénicité de la mutation identifiée, et d'autre part, de connaître l'effet d'un dysfonctionnement de la protéine ISCA1 sur la fonctionnalité des protéines Fe-S mitochondriales des complexes de la CRM et de la protéine LIAS pour mieux positionner la protéine ISCA1 dans les étapes tardives de maturation des protéines Fe-S.

3.1 Présentation clinique et données préliminaires

Le patient rapporté ici est un garçon, sixième enfant d'un couple consanguin d'origine égyptienne. Il est né prématurément à 33 semaines d'aménorrhée par césarienne suite à la présence d'un hématome rétro-placentaire. A 18 mois, la marche est acquise et les premiers mots sont prononcés vers 20 mois. A cet âge apparaissent un déficit moteur du membre supérieur gauche sans spasticité, associé à un syndrome tétrapyramidal spastique des membres inférieurs. A la suite de cet épisode, une régression des acquisitions est notée avec perte de la marche autonome et du langage. Vers 30 mois, la position assise est conservée, et quelques pas peuvent être effectués avec aide. Il n'y a pas de perte de contact. A 3 ans et demi, la marche est relativement stable et autonome avec une fatigabilité au bout de 20 à 30 mètres. A cet âge, l'examen clinique ne montre pas d'amélioration franche avec un syndrome pyramidal spastique des membres inférieurs associé au déficit du membre supérieur gauche, sans signe de neuropathie, et sans organomégalie. Un

retard de langage est noté avec apraxie, lexique limité, sans construction de phrase. Il n'a pas de troubles de prises alimentaires. Il est scolarisé quelques heures par semaine avec une aide de vie scolaire. A 4 ans et demi, il a récupéré la marche et la course malgré des chutes fréquentes et une fatigabilité importante. Le langage a progressé bien que la construction de phrases ne soit pas acquise.

A l'âge de 20 mois, l'IRM cérébrale a mis en évidence une leucodystrophie, sans calcifications au scanner cérébral. A l'âge de 2 ans, l'IRM cérébrale montrait une leucodystrophie cavitaire avec lésions diffuses de la substance blanche sustentorielle dont la périphérie apparaît en hypersignal. Ces images étaient stables lors d'un contrôle de l'IRM cérébrale réalisé à l'âge de 4 ans, avec apparition d'un pic de lactate à la spectroscopie. Le fond d'œil, effectué à l'âge de 2 ans, était normal.

Au début de la maladie, les analyses biologiques réalisées ont éliminé une leucodystrophie métaglycémique (absence de sulfatides urinaires, protéinurie normale), une anomalie lysosomale (activité hexosaminidase et arylsulfatase A normales), un dysfonctionnement des peroxysomes (profil normal des acides gras à très longue chaîne). Les profils chromatographiques des acides aminés dans le sang et le LCR étaient normaux, sans augmentation de la glycine. Le dosage de l'interféron alpha était négatif dans le LCR ce qui a éliminé une encéphalite d'origine virale. Dans le LCR, le dosage de lactate et de pyruvate était sans particularité. Dans le sang, une hyperlactatémie à 3,20 mmol/L (N<2 mmol/L) avec hyperpyruvicémie à 0,23 mmol/L (N<0,15 mmol/L) étaient notés soit un rapport lactate/pyruvate normal à 13,9. Ces résultats biologiques et l'ensemble du tableau clinique de ce patient étaient compatibles avec un déficit en PDHc ou une cytopathie mitochondriale. Une biopsie de peau prélevée à l'âge de 30 mois est transmise dans le service de biochimie de Bicêtre pour doser l'activité du complexe PDHc et étudier la chaîne respiratoire. Les résultats sont présentés dans le Tableau 11.

	Résultat	Valeurs de références
<i>Consommation en O₂ sur cellules perméabilisées (nmol O₂/min/mg protéine)</i>		
Oxydation du pyruvate	2,8	2,6 - 4,9
Oxydation du succinate	4,6	5,2 - 9
Oxydation du glycérol-3-phosphate	3,8	3,4 - 5,5
Oxydation du décylubiquinol	9,4	6,6 - 10,6
<i>Activités des différents complexes de la CRM (nmol/min/mg protéine)</i>		
Complexe II	11	11 - 19
Complexe III	69	33 - 67
Complexe II+III	20	14 - 29
Complexe IV	64	41 - 81
<i>Activités des enzymes du cycle de Krebs (nmol/min/mg protéine) et de PDHc (pmol/min/mg protéine)</i>		
Citrate synthase	47	31 - 65
Alpha-KGDHc	3,7	3,6 – 7,2
PDHc	1013	1170 - 3104

Tableau 11 : Mesure de la consommation en O₂ et des activités des complexes II à IV de la CRM, d'enzymes du cycle de Krebs et de PDHc dans les fibroblastes du patient ISCA1.

La consommation en O₂ est mesurée dans les cellules perméabilisées à la digitonine. Les autres activités sont mesurées sur un homogénat de fibroblastes. Les résultats anormaux sont indiqués en gras.

L'activité PDHc dosée sur les fibroblastes est modérément diminuée et l'étude de la chaîne respiratoire montre une faible respiration cellulaire, notamment avec le succinate, associée à une diminution de l'activité du complexe II. Les autres activités enzymatiques restent dans les intervalles de référence.

L'analyse par next generation sequencing (NGS) d'un panel de 150 gènes codant pour des protéines mitochondriales impliquées ou potentiellement impliquées dans des pathologies a mis en évidence un variant homozygote c.302A>G, soit au niveau protéique p.Tyr101Cys, dans l'exon 4 du gène *ISCA1* (RefSeq NM_030940.3, Figure 37). Le père et la mère du patient étaient porteurs de la mutation à l'état hétérozygote.

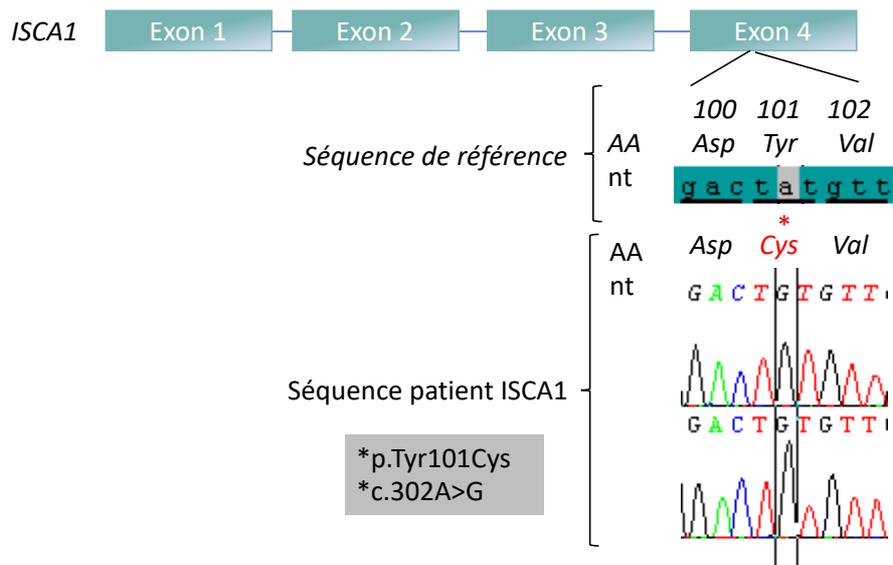


Figure 37 : Représentation schématique de la mutation p.Tyr101Cys identifiée chez le patient ISCA1.

Le gène *ISCA1* comporte 4 exons. La mutation c.302A>G, soit au niveau protéique p.Tyr101Cys, est située dans l'exon 4. AA : acides aminés, nt : nucléotides.

Cette variation faux-sens est prédite comme délétère par les logiciels de prédiction *in silico* (SIFT, mutation Taster, POLYPHEN2). Elle n'est pas répertoriée comme polymorphisme dans les bases de données dbSNP et EXAC. L'étude 3D de la protéine mutée par rapport à la protéine sauvage a été étudiée par le logiciel HOPE (Venselaar et al. 2010). La tyrosine en position 101 est un acide aminé, très conservé chez les mammifères et la levure *Candida elegans*, qui possède une liaison hydrogène avec la sérine en position 108, dans le noyau de la protéine. La protéine mutée perdrait l'interaction avec ce résidu du fait d'une différence importante de taille et d'hydrophobicité entre la cystéine et la tyrosine.

3.2 Le déficit en ISCA1 affecte la fonctionnalité de la CRM par déficit des complexes I et II

Le patient présentant un tableau clinique avec expression musculaire, les conséquences biochimiques du déficit en ISCA1 pourraient donc mieux s'exprimer dans le muscle que dans les fibroblastes, tissu dans lequel les anomalies biochimiques obtenues sont peu importantes. Une biopsie musculaire suivie d'une culture des myoblastes avait été réalisée chez ce patient, les activités du complexe

KGDHc et des complexes de la CRM ont pu être mesurées dans les myoblastes et comparées à celles obtenues dans les fibroblastes.

Afin d'évaluer l'efficacité des enzymes du carrefour du pyruvate et des différents complexes de la CRM, la consommation en oxygène est mesurée par polarographie sur fibroblastes et myoblastes du patient ISCA1, comparativement à ceux d'un témoin, en présence de différents substrats (pyruvate, malate et succinate). En présence de pyruvate, la consommation en O₂ permet d'évaluer la fonctionnalité du complexe PDHc et de l'ensemble des complexes de la CRM. Lorsque le malate est ajouté en quantité plus importante que le pyruvate, la consommation en O₂ mesurée correspond à l'efficacité des complexes de la CRM. Le succinate, quant à lui, est un substrat dédié au complexe II de la CRM, et donc la consommation en O₂ mesurée en présence de succinate est reliée à la fonctionnalité des complexes II, III et IV. Une diminution de consommation en O₂ par un ou plusieurs substrats permet d'évaluer une atteinte du complexe PDHc, du complexe I ou du complexe II. Les résultats sont présentés dans la Figure 38.

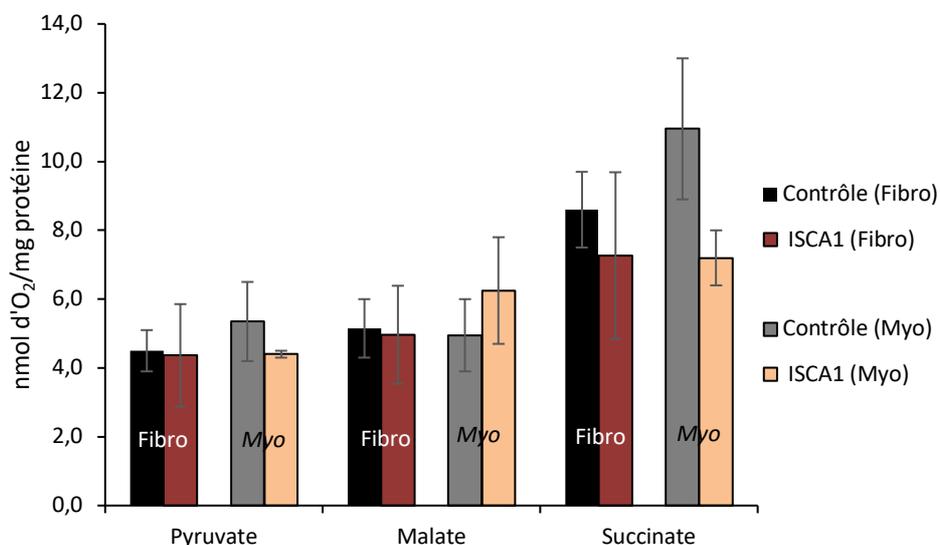


Figure 38 : Mesure de la consommation en O₂ dans les fibroblastes et les myoblastes du patient ISCA1 en présence de pyruvate, de malate ou de succinate.

En présence de pyruvate, la consommation en O₂ reflète l'efficacité du complexe PDHc et des complexes I à IV de la CRM. En présence de malate, la consommation en O₂ reflète l'efficacité des complexes I à IV de la CRM. En présence de succinate, la consommation en O₂ reflète l'efficacité des complexes II, III et IV de la CRM. Les fibroblastes et myoblastes contrôles sont représentés en noir et gris respectivement. Les fibroblastes du patient sont représentés en rouge et les myoblastes en orange. Les résultats sont la moyenne de deux expérimentations indépendantes. La barre d'erreur représente l'écart-type.

Cette étude par polarographie montre une respiration cellulaire équivalente entre les cellules du patient ISCA1 et celles du témoin en présence de pyruvate et de malate aussi bien dans les fibroblastes que dans les myoblastes. En présence de succinate, la consommation d'O₂ diminue pour le patient ISCA1 par rapport au contrôle dans les deux tissus, avec un effet plus prononcé dans les myoblastes. Le succinate étant le substrat du complexe II, ces résultats sont cohérents avec la diminution de l'activité du complexe II observée précédemment dans les fibroblastes (Tableau 11).

Les activités des complexes I, II, III et IV de la CRM et de KGDHc ont été également mesurées dans les fibroblastes et les myoblastes du patient ISCA1, et rapportées à celles de fibroblastes et de myoblastes témoins. Les résultats sont présentés sur la Figure 39.

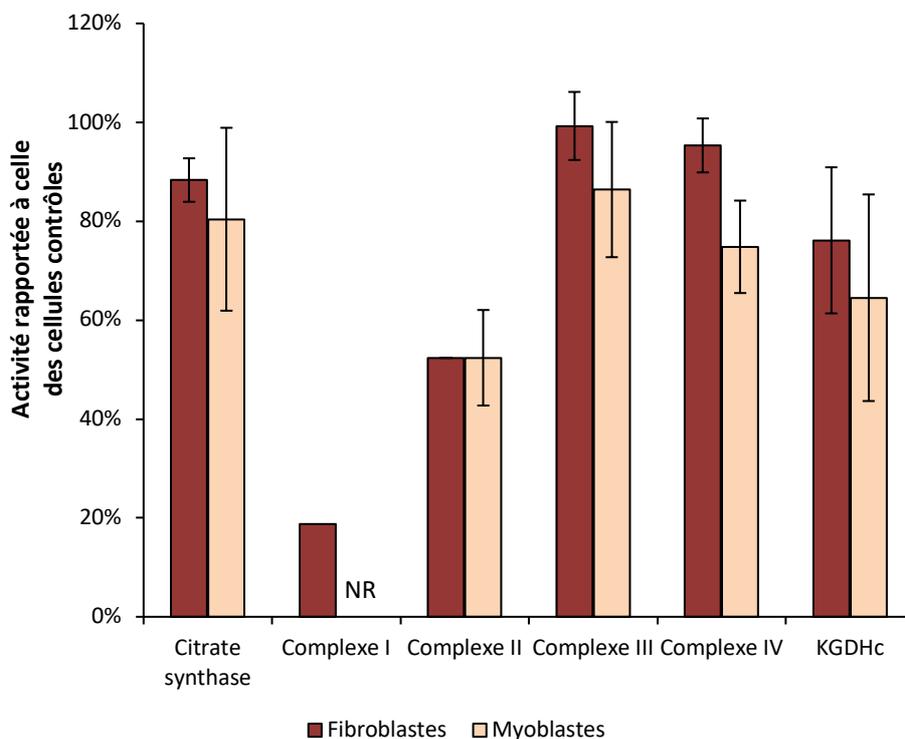


Figure 39 : Activités enzymatiques relatives des complexes de la CRM, de la citrate synthase et de KGDHc dans les fibroblastes et les myoblastes du patient ISCA1.

L'activité enzymatique mesurée dans les fibroblastes (rouge) et les myoblastes (orange) est rapportée à celle des cellules contrôles du jour dans le même tissu. Toutes les expérimentations (sauf pour l'activité du complexe I) sont réalisées sur homogénat cellulaire et les résultats représentent la moyenne de deux expérimentations indépendantes. La barre d'erreur représente l'écart-type. L'activité du complexe I est mesurée sur fractions enrichies en mitochondries de fibroblastes du patient et du contrôle (expérimentation unique) et n'a pas été mesurée dans les myoblastes (NR). L'activité de la citrate synthase est le reflet de la quantité de mitochondries dans l'échantillon. NR : non réalisé. Les résultats des activités brutes sont disponibles dans l'annexe 2.

Les activités relatives des complexes de la CRM dans les fibroblastes et myoblastes du patient ISCA1 donnent des résultats équivalents. Le complexe II est diminué de 50 % tandis que les activités des complexes III et IV sont normales. Le complexe I, étudié uniquement dans les fibroblastes dans une expérience, a une activité résiduelle de 20%. L'activité de KGDHc reste proche de celle du témoin, bien que légèrement diminuée. Ainsi, seule une diminution des activités des complexes I et II semble être présente chez le patient ISCA1. Les activités obtenues dans les fibroblastes et les myoblastes étant similaires entre les deux types cellulaires, les explorations ont donc été poursuivies uniquement sur fibroblastes.

L'étude par BN-PAGE permet d'interpréter l'intégrité des complexes de la CRM. Les résultats obtenus dans les fibroblastes du patient ISCA1 (Figure 40) montrent une atteinte de l'intégrité des complexes I et II. L'intégrité du complexe IV est également altérée, bien que son activité enzymatique soit normale dans les fibroblastes du patient ISCA1.

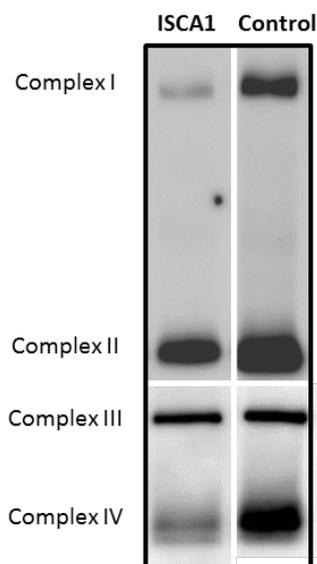


Figure 40 : Etude par BN- PAGE de l'intégrité des complexes I, II, III et IV de la CRM dans les fibroblastes du patient ISCA1.

Les anticorps dirigés contre GRIM19 (complexe I), SDHA (complexe II), UQCRC2 (complexe III) et MTCO1 (complexe IV) ont été utilisés. Chaque échantillon est un enrichissement en mitochondries de fibroblastes.

3.3 Le déficit en ISCA1 affecte essentiellement les protéines [4Fe-4S]

Le déficit en ISCA1 n'étant pas encore décrit au début de ce travail de thèse, j'ai étudié l'impact de cette anomalie sur la fonctionnalité et/ou l'intégrité de certaines protéines Fe-S mitochondriales, comme réalisé avec les patients précédemment étudiés, afin de contribuer aux connaissances sur le positionnement d'ISCA1 dans l'étape tardive de la biogenèse des protéines Fe-S.

- **Le déficit en ISCA1 induit une diminution modérée de la lipoylation des protéines.**

L'étude par immunoblot des protéines lipoylées (KGDHc et PDHc) permet d'évaluer indirectement l'activité de la protéine LIAS qui est dépendante de l'assemblage de deux centres [4Fe-4S]. Les résultats sont présentés ci-dessous (Figure 41).

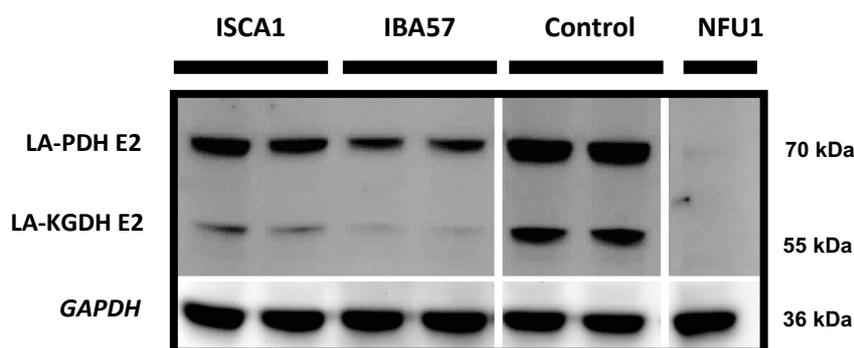


Figure 41 : Etude par immunoblot de protéines lipoylées dans les fibroblastes des patients ISCA1, IBA57 et NFU1.

L'anticorps dirigé contre l'acide lipoïque reconnaît les complexes KGDHc (55 kDa) et PDHc (70 kDa), qui possèdent l'acide lipoïque comme cofacteur covalent. Les échantillons sont des homogénats de fibroblastes. Les échantillons contrôles et ceux des patients ISCA1 et IBA57 ont été déposés en double. La GAPDH sert de contrôle de charge.

Pour le patient ISCA1, j'observe une diminution importante de la lipoylation du complexe KGDHc et une diminution plus modérée de la lipoylation du complexe PDHc. Cette diminution de la lipoylation est moins marquée pour le patient ISCA1 que pour les patients IBA57 et NFU1. Pour vérifier ces résultats, j'ai observé l'acide lipoïque par immunofluorescence dans les fibroblastes du patient ISCA1 comparativement à des fibroblastes contrôles (Figure 42).

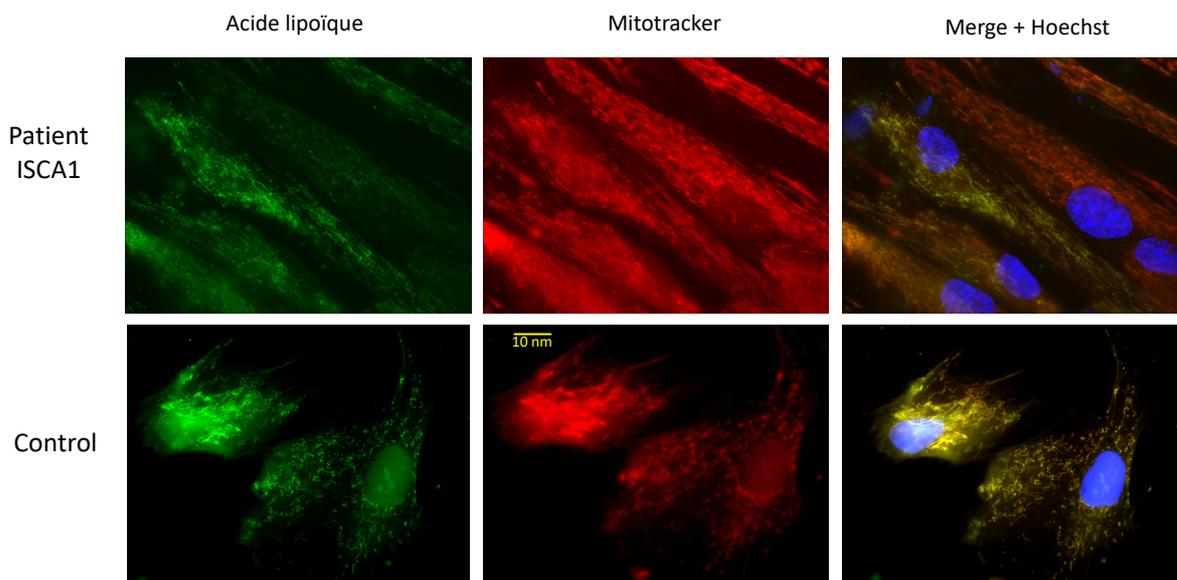


Figure 42 : Visualisation de l'acide lipoïque en microscopie à fluorescence dans les fibroblastes du patient ISCA1.

Gauche : visualisation (en vert) de l'acide lipoïque avec un anticorps spécifique. Milieu : visualisation du réseau mitochondrial (en rouge) à l'aide du Mitotracker. Droite : visualisation de l'acide lipoïque, du réseau mitochondrial (Mitotracker) et du noyau cellulaire (Hoechst, en bleu). Haut : fibroblastes du patient ISCA1. Bas : fibroblastes immortalisés contrôles. Objectif x100 (1,3 NA). L'échelle est la même pour toutes les images (mêmes réglages).

L'observation de l'acide lipoïque dans les fibroblastes des cellules contrôles montre une répartition homogène de l'acide lipoïque dans la cellule et, ceci dans toutes les cellules. La colocalisation avec le Mitotracker montre que l'acide lipoïque est localisé dans la mitochondrie. Dans les fibroblastes du patient ISCA1, il existe une hétérogénéité de la quantité de l'acide lipoïque entre les cellules, car l'acide lipoïque est indétectable dans certaines cellules. Ces résultats confirment une diminution modérée d'acide lipoïque dans les fibroblastes du patient ISCA1, en accord avec les résultats obtenus par immunoblot des protéines lipoylées. La quantité résiduelle d'acide lipoïque mise en évidence est probablement suffisante pour maintenir une activité des complexes KGDHc et de PDHc proches des valeurs normales.

- **SDHB et la ferrochélatase sont diminuées dans le déficit en ISCA1**

Les protéines mitochondriales SDHB, mt-aconitase (protéines à centres [4Fe-4S], la protéine Rieske et la ferrochélatase (protéines à centres [2Fe-2S]) et la protéine

NDUFS5 du complexe I ont été étudiées par immunoblot dans les fibroblastes du patient ISCA1 (Figure 43).

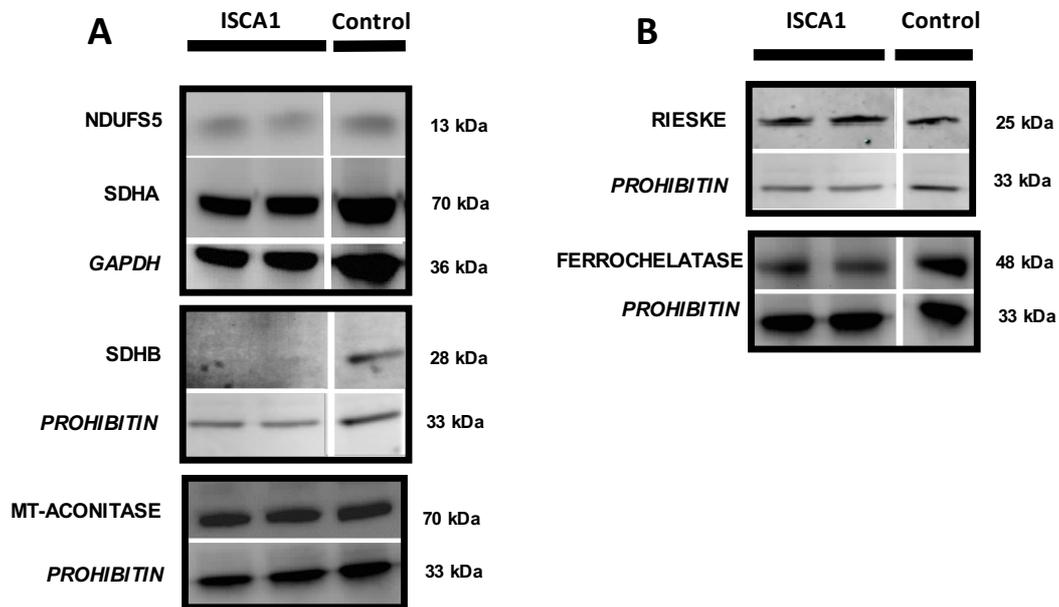


Figure 43 : Immunoblot de protéines mitochondriales à centre Fe-S et de sous-unités de complexes de la CRM ne portant pas de centre Fe-S dans les fibroblastes du patient ISCA1.

A : détection des protéines NDUFS5 (complexe I) et SDHA (complexe II), qui ne contiennent pas de centres Fe-S ; SDHB (complexe II) et mt-aconitase, protéines à centre [4Fe-4S]. B : détection des protéines à centre [2Fe-2S] Rieske (complexe III) et ferrochélatase. GAPDH et prohibitin sont des contrôles de charge lorsque l'expérimentation est réalisée sur un homogénat ou des fractions enrichies en mitochondries de fibroblastes respectivement. Pour le patient ISCA1, le même échantillon est déposé en double sur le gel.

Les résultats montrent une forte diminution de SDHB, et une diminution plus modérée de la ferrochélatase, protéine à centre [2Fe-2S]. Les protéines NDUFS5, SDHA, mt-aconitase et la protéine ne sont, quant à elles, pas affectées. Le déficit de la protéine SDHB, protéine à centre [4Fe-4S], est concordant avec la diminution de l'activité du complexe II mise en évidence dans les fibroblastes et les myoblastes du patient ISCA1. Le déficit en ISCA1 semble affecter certaines protéines [2Fe-2S] et [4Fe-4S].

3.4 Le réseau mitochondrial n'est pas affecté par le déficit en ISCA1

Le réseau mitochondrial a une morphologie adaptée au métabolisme des oxydations phosphorylantes qui s'équilibre entre fusion et fission. Afin d'évaluer si la

diminution des activités des complexes I et II et l'atteinte de l'intégrité de ces deux complexes et du complexe IV pouvaient modifier l'aspect du réseau mitochondrial, ce dernier a été observé dans les fibroblastes du patient ISCA1 par immunofluorescence à l'aide du Mitotracker (Figure 44).

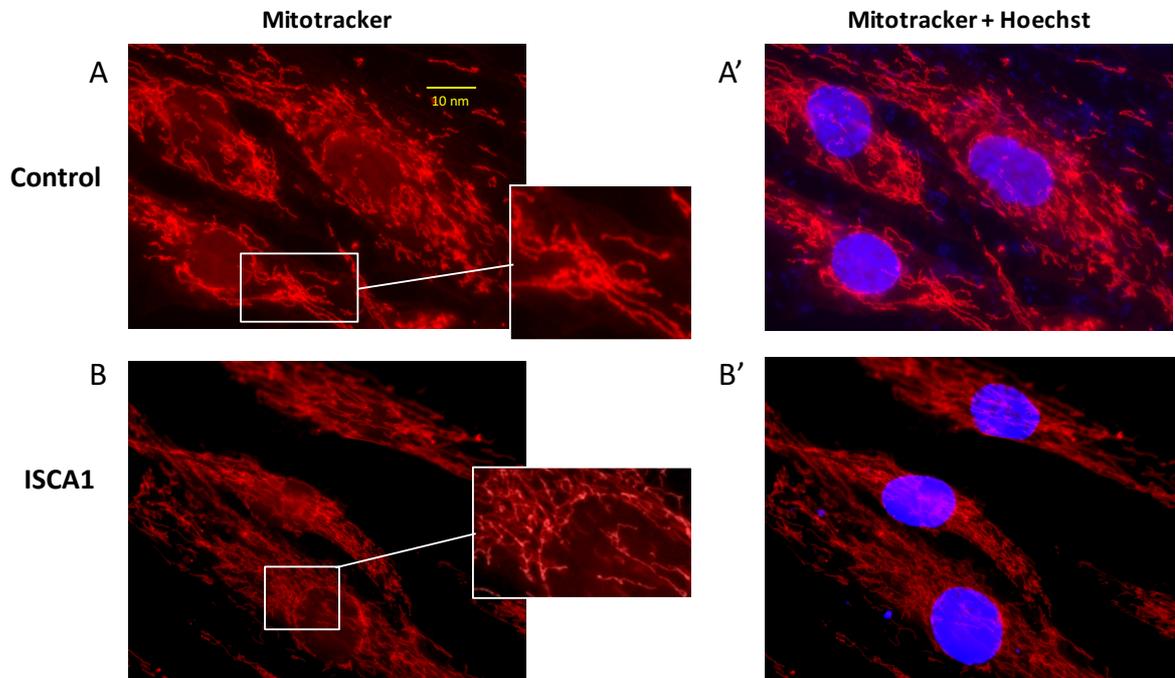


Figure 44 : Réseau mitochondrial observé par microscopie à fluorescence dans les fibroblastes du patient ISCA1.

A et A' : visualisation dans les fibroblastes immortalisés contrôles du réseau mitochondrial (Mitotracker, en rouge) (A) associé au noyau cellulaire (Hoechst, en bleu) (A'). B et B' : visualisation dans les fibroblastes du patient ISCA1 du réseau mitochondrial (Mitotracker) (B) associé au noyau cellulaire (Hoechst) (B'). Objectif x100 (1,3 NA). L'image représentée par un rectangle blanc correspond à un grossissement numérique plus important de la zone encadrée. L'échelle précisée sur la figure A est la même pour toutes les images (mêmes réglages).

Les mitochondries forment un réseau d'aspect filamenteux, homogène, réparti sur l'ensemble de la surface cellulaire des fibroblastes du patient, comme dans les cellules contrôles. Il n'y a donc pas de modification majeure de l'aspect du réseau mitochondrial dans les fibroblastes du patient ISCA1 étudié.

3.5 La protéine IBA57 est augmentée dans les cellules déficitaires en ISCA1, alors que la protéine ISCA1 augmente dans les cellules déficitaires en ISCA2

Le lien de fonctionnalité entre les protéines ISCA1, ISCA2 et IBA57 étant encore non élucidé chez l'homme, j'ai étudié le profil des protéines ISCA1, ISCA2 et IBA57 dans les fibroblastes du patient ISCA1 mais aussi dans ceux d'un patient ISCA2 (P12) et d'un patient IBA57 (P10) (Figure 45).

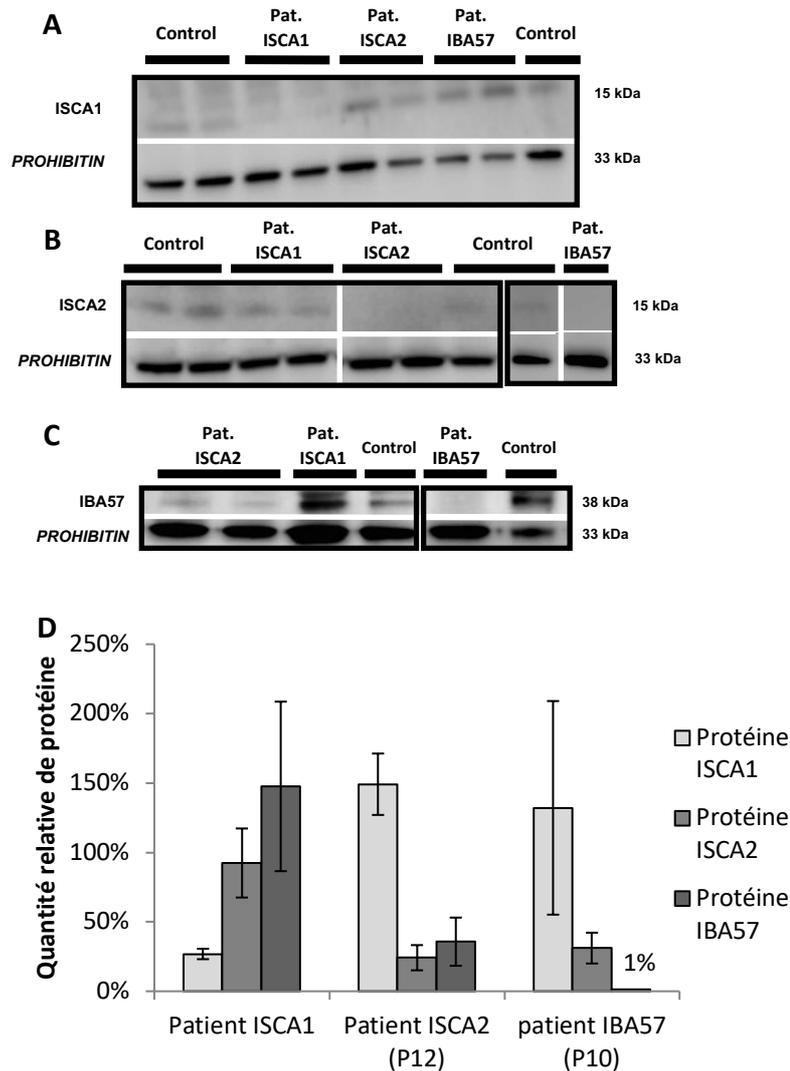


Figure 45 : Immunoblot des protéines ISCA1, ISCA2 et IBA57 dans les fibroblastes de patients ayant un déficit en ISCA1, en ISCA2 ou en IBA57.

Les protéines ISCA1 (A), ISCA2 (B), et IBA57 (C) sont détectées par des anticorps spécifiques. La prohibitine (A, B, C) sert de contrôle de charge du gel. Les échantillons sont des fractions enrichies en mitochondries de fibroblastes et sont déposés en double lorsque cela a été possible. La quantité protéique relative (D) a été obtenue en comparant le rapport protéine/prohibitine de chaque échantillon à celui du contrôle sur le même gel. Elle a été réalisée à l'aide du logiciel Image J et les résultats sont la moyenne d'au moins deux expérimentations indépendantes. La barre d'erreur représente l'écart-type.

Les trois patients présentent une nette diminution de la protéine correspondant à leur déficit dans les fibroblastes. Le déficit en ISCA2 induit une diminution des deux protéines ISCA2 et IBA57 et une augmentation de la protéine ISCA1. Dans le déficit en IBA57, les deux protéines ISCA2 et IBA57 sont aussi nettement diminuées, tandis que la protéine ISCA1 semble aussi augmentée. Dans le déficit en ISCA1, la protéine IBA57 est modérément augmentée alors que la quantité d'ISCA2 ne varie pas. Ainsi, il semblerait que des mécanismes de compensation protéique soient mis en place entre les protéines ISCA1, ISCA2 et IBA57 en cas de déficit de l'une d'elles.

3.6 Discussion

Actuellement, seuls six cas de déficit en ISCA1 issus de quatre familles ont été rapportés (Shukla et al. 2017; Torracco et al. 2018; Shukla et al. 2018) (Tableau 12).

Nombre de patients	Génotype <i>ISCA1</i> NM_030940.3	Présentation clinique	Référence
5 patients (3 familles)	c.[259G>A];[259G>A] p.[Glu87Lys];[Glu87Lys]	Encéphalopathie précoce et sévère. Décès entre 11 mois et 5 ans	(Shukla et al. 2017; Shukla et al. 2018)
1 patient	c.[29T>G];[29T>G] p.[Val10Gly];[Val10Gly]	Retard des acquisitions, dysarthrie, nystagmus, sévère ataxie spastique. Décès à 11 ans.	(Torraco et al. 2018)
1 patient	c.[302A>G];[302A>G] p.[Tyr101Cys];[Tyr101Cys]	Retard des acquisitions, dysarthrie. Actuellement scolarisé à 5 ans.	Ce travail

Tableau 12 : Génotype et résumé clinique des différents patients avec mutation dans le gène *ISCA1*.

Cinq patients d'origine indienne présentaient un tableau clinique d'encéphalopathie sévère débutant précocement, décrit comme un syndrome MMDS de type 5, associés à la mutation p.Glu87Lys à l'état homozygote (Shukla et al. 2017; Shukla et al. 2018). Les premiers symptômes se sont manifestés à l'âge de 3 mois avec un retard sévère des acquisitions, une détérioration neurologique avec spasticité ou épilepsie. L'IRM cérébrale montrait une pachygyrie, une leucodystrophie au niveau de la substance blanche cérébrale et cérébelleuse et une dilatation des ventricules. Les patients sont décédés entre 11 mois et 5 ans. Pour ces

cinq patients d'origine indienne, aucune étude biochimique n'a été effectuée. Le sixième patient, décrit par une équipe italienne (Torraco et al. 2018), présentait un nystagmus et des difficultés d'alimentation à l'âge de 3 mois. Vers 11 mois, une leucodystrophie était présente à l'IRM cérébrale, et associée à des vacuoles lors du contrôle de l'imagerie à l'âge de 4 ans. Par la suite, le patient présentait un retard majeur des acquisitions mais avec une progression (tenue assise à 4 ans, puis acquisition du langage). A l'âge de 6 ans, il présentait une dysarthrie importante, un syndrome spastique ataxique sévère et une persistance du nystagmus. Il est décédé à l'âge de 11 ans. La pathologie est causée par la mutation homozygote p.Val10Gly dans le gène *ISCA1*. Cette mutation est située dans la séquence d'adressage mitochondrial de la protéine et entraîne un déficit d'import de la protéine mature dans la mitochondrie. Le patient décrit dans mon étude (*ISCA1*^{Tyr101Cys}) présente un tableau de régression des acquisitions débutant plus tardivement (vers 20 mois), avec une ataxie et une récupération progressive des acquisitions, proche du tableau clinique de ce dernier patient (patient *ISCA1*^{Val10Gly}). Chez ces deux patients, une diminution de la quantité protéique d'*ISCA1* est observée, confirmant la pathogénicité de la mutation.

Le déficit en *ISCA1* entraîne un dysfonctionnement de protéines mitochondriales de la CRM et de protéines Fe-S. L'équipe de Torraco et al. 2018 a mis en évidence, dans le muscle, une diminution quantitative des protéines [4Fe-4S] telles que LIAS, mt-aconitase, NDUFS1 et SDHB. La diminution de LIAS entraîne un défaut de synthèse d'acide lipoïque et la diminution des protéines NDUFS1 et SDHB avec une atteinte des complexes I et II respectivement. Le patient *ISCA1*^{Tyr101Cys} que j'ai décrit présente un profil similaire avec une diminution de la lipoylation, et donc de l'activité de PDHc et KGDHc, dans les fibroblastes. Cependant, le niveau résiduel de lipoylation de ces protéines est plus élevé dans les fibroblastes de ce patient comparé au niveau résiduel chez le patient *ISCA1*^{Val10Gly} (Torraco et al. 2018). L'activité et l'intégrité des complexes I et II de la CRM sont altérées dans les fibroblastes du patient *ISCA1*^{Tyr101Cys}. L'atteinte du complexe II est liée au déficit en SDHB mis en évidence chez ce patient, comme chez le patient *ISCA1*^{Val10Gly} (Torraco et al. 2018). Cependant, la protéine NDUFS5 du complexe I et l'aconitase mitochondriale ne sont pas affectées chez mon patient alors qu'elles sont diminuées chez la souris déplétée en *ISCA1* (Beilschmidt et al. 2017). D'autre part, j'ai observé

une tendance à la diminution d'une protéine [2Fe-2S], la ferrochélatase, alors que la protéine Rieske n'est pas affectée. Inversement, *in cellulo* et *in vivo* chez la souris, la ferrochélatase n'est pas diminuée (Sheftel et al. 2012; Beilschmidt et al. 2017) alors que la protéine Rieske peut être affectée (Sheftel et al. 2012).

Étudiée depuis une dizaine d'années, la fonctionnalité de la protéine ISCA1 dans la machinerie de la biogenèse des protéines Fe-S n'est pas encore complètement établie et est encore controversée. Dès 2004, la localisation de la protéine humaine ISCA1 dans la mitochondrie est démontrée et son rôle dans la biogenèse des centres Fe-S est suggéré (Cózar-Castellano et al. 2004). En 2012, le rôle d'ISCA1 dans la maturation des protéines Fe-S, en partenariat avec ISCA2 et IBA57, a été proposé dans une étude sur les cellules HeLa (Sheftel et al. 2012). Puis, d'autres études *in vitro* ont identifié la protéine ISCA1 et sa partenaire ISCA2, dans la formation du centre [4Fe-4S] à partir de deux centres [2Fe-2S] (Brancaccio et al. 2014; Brancaccio et al. 2017). *In vitro*, il a été montré que GLRX5 peut transférer un centre [2Fe-2S] à la protéine ISCA1 (Banci et al. 2014) ou à l'hétérodimère ISCA1-ISCA2 (Brancaccio et al. 2014). Récemment, les études *in vivo* chez la souris et *in vitro* suggère qu'ISCA1, sous forme d'homodimère, peut réaliser le transfert d'un centre 4Fe-4S à partir de deux centres [2Fe-2S] apportés par GLRX5. Ce transfert ne nécessiterait ni ISCA2, ni IBA57 et pourrait être réalisé en partenariat avec NFU1 (Beilschmidt et al. 2017). L'ensemble de ces études laissent supposer qu'il existe plusieurs voies de maturation des protéines à centre [4Fe-4S] dans lesquelles ISCA1 est fortement impliquée, ce qui confirme l'atteinte de la fonctionnalité de LIAS, de SDHB et du complexe I dans les fibroblastes des deux patients ISCA1 (mon étude et (Torraco et al. 2018)). L'atteinte du complexe IV dans les fibroblastes de deux patients déficitaires en ISCA1 (mon étude, (Torraco et al. 2018)) ou dans les cellules HeLa déplétées en ISCA1 (Sheftel et al. 2012) n'est pas expliquée par cette fonction d'ISCA1. La diminution de la ferrochélatase mise en évidence dans les fibroblastes du patient ISCA1^{Tyr101Cys} pourrait entraîner une diminution de la synthèse de l'hème et donc expliquer l'atteinte de l'intégrité du complexe IV observée puisque le complexe IV est un complexe porteur de deux centres hémiques. Cette hypothèse est en accord avec une étude suggérant le rôle de la protéine ISCA1 dans la synthèse de l'hème (Nilsson et al. 2009). Cependant, le complexe IV est également affecté par les déficits en NFU1, ISCA2 ou IBA57 dans mon étude ou d'autres études

sans diminution de la quantité de ferrochélatase (Ahting et al. 2015; Alaimo et al. 2018; Torracco et al. 2017), ce qui est en faveur d'une voie commune dans les anomalies de la biogenèse des protéines Fe-S menant au dysfonctionnement du complexe IV, qui reste à déterminer.

Un équilibre entre les différentes voies de maturation des protéines [4Fe-4S] entre ISCA1, ISCA2 et IBA57 permettrait de s'adapter aux besoins et aux conditions cellulaires. *In cellulo*, une compensation du déficit en ISCA1 par ISCA2 pourrait exister (Sheftel et al. 2012). En revanche, les études *in vivo* ne sont pas en accord avec ces résultats. Dans les déficits en ISCA1 étudiés, la protéine ISCA2 ne varie pas (patient ISCA1^{Tyr101Cys} de mon étude) ou diminue (patient ISCA1^{Val10Gly} (Torraco et al. 2018)) et l'étude chez la souris montre que le déficit en ISCA1 ne peut être compensé par ISCA2 (Beilschmidt et al. 2017). D'autre part, chez un patient déficitaire en ISCA2, j'ai mis en évidence une augmentation de la protéine ISCA1. Ainsi, il pourrait exister *in vivo* un mécanisme de compensation du déficit de la protéine ISCA2 par augmentation d'ISCA1 mais pas dans le sens inverse. Dans les cellules du patient IBA57, on retrouve le même profil que dans les fibroblastes du patient ISCA2 (forte diminution d'ISCA2 et augmentation modérée d'ISCA1), en accord avec les résultats obtenus pour d'autres patients IBA57 (Torraco et al. 2017). Ces résultats peuvent s'expliquer par le rôle stabilisateur de la protéine IBA57 sur la protéine ISCA2 et son centre [2Fe-2S] au sein de l'hétérodimère [2Fe-2S]-ISCA2-IBA57 formé (Gourdoupis et al. 2018). Par contre, la protéine IBA57 semble augmenter dans le déficit en ISCA1 *in cellulo* (Sheftel et al. 2012) ou *in vivo* chez le patient étudié ici (ISCA1^{Tyr101Cys}). Par contre, dans les autres études portant sur les déficits en ISCA1 chez la souris ou l'homme, la quantité de la protéine IBA57 n'est pas modifiée (Beilschmidt et al. 2017; Torracco et al. 2018). L'impact du déficit en ISCA1 sur la protéine IBA57 nécessite d'autres expérimentations comme la quantification de l'ARNm d'IBA57 pour mieux évaluer une modification de la synthèse protéique d'IBA57 chez des patients déficients en ISCA1.

Bien que plusieurs protéines mitochondriales soient altérées dans les fibroblastes du patient ISCA1, l'aspect du réseau mitochondrial reste tubulaire, comme dans les cellules du témoin. Dans le déficit en ISCA2, des auteurs avaient rapporté une modification de l'aspect du réseau mitochondrial dans les fibroblastes d'un patient

ISCA2 avec un réseau préférentiellement réparti dans l'espace périnucléaire, en lien avec une déplétion de l'ADNmt (Alaimo et al. 2018). De même, les cellules HeLa déplétées en IBA57, ISCA1 et ISCA2 ont une morphologie mitochondriale modifiée avec élargissement des mitochondries et une perte des crêtes mitochondriales, pouvant être également causées par une diminution de l'ADNmt (Sheftel et al. 2012). L'élargissement de mitochondries a aussi été mis en évidence dans des cellules HeLa déplétées en protéines impliquées dans les étapes précoces de la biogenèse des centres Fe-S (ISCU, NFS1, MFRN2, HSC20) (Ferecatu et al. 2018). Mes résultats n'ont pas montré de telles anomalies mitochondriales dans les fibroblastes du patient ISCA1^{Tyr101Cys} probablement car le phénotype biochimique observé est plutôt modéré chez ce patient et que la protéine ISCA1 est positionnée en aval de ces protéines dans la voie de biogenèse des centres Fe-S.

Cette étude rapporte le septième cas de déficit en ISCA1 porteur d'une nouvelle mutation dans le gène. Chez ce patient, un déficit modéré en PDHc secondaire à une diminution de la synthèse de l'acide lipoïque, associé à une atteinte des complexes I et II de la CRM sont les principaux signes biochimiques identifiés dans les fibroblastes. Le déficit en ISCA1 peut donc être considéré comme un MMDS, et l'expression clinique de ce déficit varie selon la mutation identifiée. Notre étude suggère qu'il existe des interactions entre les protéines ISCA1, ISCA2 et IBA57 et qu'il pourrait exister des mécanismes de compensation entre ces protéines, lorsque l'une d'entre elles est déficitaire.

CHAPITRE 4 :
DISCUSSION GENERALE ET
PERSPECTIVES

La biogenèse mitochondriale des centres Fe-S est constituée de trois étapes qui sont la formation *de novo* d'un centre [2Fe-2S] sur la protéine ISCU, son transfert sur GLRX5 ou sur une protéine LYR et une étape finale de maturation comprenant des voies spécifiques dédiées pour les protéines [2Fe-2S] et [4Fe-4S]. Parmi les protéines impliquées dans ces dernières étapes, les données actuelles de la littérature indiquent que les protéines IBA57, ISCA1 et ISCA2 interviendraient probablement dans la formation du centre [4Fe-4S] tandis que NFU1 et BOLA3 transfèreraient le centre [4Fe-4S] dans les protéines cibles (Ciofi-Baffoni et al. 2018). La voie de lipoylation des protéines est, elle aussi, mitochondriale. Cette voie requiert trois enzymes LIPT1, LIPT2 et LIAS. L'enzyme LIAS porte deux centres [4Fe-4S], essentiels à son activité. L'insertion de ses centres [4Fe-4S] dépend de l'intégrité de l'étape finale de maturation des protéines à centres [4Fe-4S]. En cas de déficit dans cette étape, des anomalies de lipoylation sont donc observées (Mayr et al. 2014).

Mes travaux ont porté sur l'étude de patients présentant un défaut de lipoylation des protéines dû à un dysfonctionnement de LIPT1 ou LIPT2, par mutation dans le gène correspondant, ou à un dysfonctionnement de LIAS par déficit en FDX1L, IBA57, ISCA1, ISCA2, BOLA3 ou NFU1. Les études ont été réalisées à partir de cultures de fibroblastes de 14 patients et ont apporté de nouvelles données concernant les anomalies métaboliques et protéiques induites par ces déficits.

1. Quatorze cultures de fibroblastes de patients portant un déficit en FDX1L, IBA57, ISCA1, ISCA2, BOLA3, NFU1, LIPT1 et LIPT2 ont été caractérisés

Au début de ce travail, plusieurs patients présentant un déficit dans les protéines LIAS (n=4), LIPT1 (n=2), BOLA3 (n=6), IBA57 (n=15), ISCA2 (n=6) et NFU1 (n=22) avaient été rapportés (Mayr et al. 2011; Baker et al. 2014; Tsurusaki et al. 2015; Soreze et al. 2013; Tort et al. 2014; Cameron et al. 2011; Haack et al. 2013; Ajit Bolar et al. 2013; Lossos et al. 2015; Debray et al. 2015; Al-Hassnan et al. 2015; Navarro-Sastre et al. 2011; Nizon et al. 2014; Invernizzi et al. 2014; Tonduti et al. 2015; Ahting et al. 2015). Au cours de mon travail, trois patients avec un déficit en LIPT2, dont celui que j'ai étudié, ont été décrits (Habarou et al. 2017), et six patients avec un déficit en ISCA1, porteurs de mutations différentes de celle du patient ISCA1 de mon étude (Shukla et al. 2017; Torraco et al. 2018; Shukla et al. 2018) ont été rapportés pour la première fois.

Les pathologies causées par un déficit en LIPT1 ou LIPT2 sont proches sur les plans clinique et radiologique. En effet, ces patients présentent une encéphalopathie sévère débutant en période néonatale associée à une atrophie corticale, une dilatation ventriculaire et une leucodystrophie parfois kystique. Sur le plan biochimique, un déficit majeur de la lipoylation et une atteinte de la respiration mitochondriale sont retrouvés dans les fibroblastes (Soreze et al. 2013; Tort et al. 2014; Habarou et al. 2017). L'étude des complexes de la chaîne respiratoire que j'ai effectuée dans les fibroblastes des patients LIPT1 et LIPT2 a montré une diminution de l'activité du complexe I dans ces deux déficits et une atteinte de l'intégrité du complexe IV dans le déficit en LIPT2. Contrairement aux déficits dans la voie de maturation des protéines Fe-S, le complexe II n'est pas affecté dans ces deux pathologies.

Parmi les pathologies liées à un dysfonctionnement dans la voie mitochondriale de maturation des protéines Fe-S, les déficits en NFU1 et BOLA3 sont les plus sévères. Les symptômes débutent précocement avec une encéphalopathie prépondérante gravissime et un décès à quelques mois ou années de vie pour la grande majorité des patients (Cameron et al. 2011; Haack et al. 2013; Ahting et al. 2015). Les patients IBA57 et les patients ISCA2 sont décrits avec certaines similarités telles qu'une atteinte musculaire parfois prépondérante (spasticité), une atteinte oculaire (atrophie optique, nystagmus) et une atteinte neurologique (Lossos et al. 2015; Al-Hassnan et al. 2015). Un seul cas de déficit en FDX1L était décrit (Spiegel et al. 2014) et présentait une symptomatologie musculaire prépondérante sans troubles neurologiques. Mon travail a permis d'accroître la connaissance de ces pathologies en rapportant le deuxième cas de déficit en FDX1L, deux nouveaux cas de déficit en BOLA3, deux patients IBA57 porteurs de 2 nouvelles mutations dans le gène *IBA57*, un patient ISCA1 porteur d'une nouvelle mutation dans *ISCA1*, deux patients avec deux nouvelles mutations dans le gène *ISCA2* et trois patients NFU1, avec trois nouvelles mutations dans le gène *NFU1*. Il a permis de confirmer qu'aucune de ces pathologies n'avait de présentation clinique spécifique, sauf le déficit en FDX1L, qui, chez le patient P13 induit une intolérance à l'effort importante, sans troubles neurologiques, ni dysfonctionnement majeur de protéines mitochondriales comparativement aux résultats des autres patients. Les anomalies biochimiques associant les dysfonctionnements des complexes I, II et des céto-acide

déshydrogénases (complexes PDHc et KGDHc) par déficit en acide lipoïque sont les marqueurs biochimiques de ces pathologies mais ne permettent pas d'orienter plus précisément le diagnostic vers une protéine spécifique impliquée dans la voie de maturation des protéines Fe-S.

L'activité et/ou l'intégrité du complexe IV est affectée dans la plupart des patients de notre étude (patients BOLA3, NFU1, IBA57, ISCA1, ISCA2 et LIPT2). Le complexe IV est constitué de deux centres héminiques, portés par la sous-unité COX1, mais ne porte ni de centre Fe-S ni de molécule d'acide lipoïque. Par conséquent, son atteinte dans ces pathologies peut être considérée comme étonnante. Plusieurs études ont montré une atteinte du complexe IV dans les tissus de patients soit par une diminution de l'activité enzymatique du complexe chez des patients avec un déficit en IBA57 (Ajit Bolar et al. 2013), NFU1 (Ahting et al. 2015) ou BOLA3 (Nishioka et al. 2018), soit par une diminution quantitative de la sous-unité COXIV chez un patient IBA57 (Torraco et al. 2017). Dans le déficit en ISCA1, ISCA2 et IBA57, une analyse large spectre de l'expression de gènes a montré la coexpression des gènes *ISCA1* et *IBA57* avec des gènes associés à la synthèse de l'hème. Et l'inhibition des gènes *ISCA1* et *IBA57* chez les embryons de poisson zèbre entraîne une profonde anémie (Nilsson et al. 2009). Cette étude suggère que les protéines ISCA1 et IBA57 peuvent participer à la synthèse de l'hème, probablement en étant impliquées dans la maturation de la ferrochélatase. L'atteinte du complexe IV observée chez certains patients déficitaires en IBA57 et ISCA1 pourrait donc être secondaire à un déficit de synthèse de l'hème par dysfonctionnement de la ferrochélatase. La diminution de la ferrochélatase a d'ailleurs été mise en évidence chez le patient ISCA1 dans mon étude. Cependant, tout comme le complexe IV, le complexe III est également composé de molécules d'hème mais ni l'activité de ce complexe ni son intégrité ne sont affectés dans les fibroblastes des patients présentant un déficit en ISCA1 ou IBA57. De plus, sur le plan clinique, aucun de ces patients ne présentait une anémie. En conclusion, l'atteinte du complexe IV par défaut de synthèse de l'hème dans les fibroblastes de patients qui ont un déficit dans la voie de maturation des protéines Fe-S, notamment ISCA1 et IBA57, est peu probable. Mes résultats ont mis en évidence une atteinte de l'intégrité du complexe IV chez plusieurs patients, notamment le patient LIPT2 dont le déficit entraîne un défaut de synthèse de l'acide lipoïque, suggérant que l'assemblage du complexe IV

est altéré par le déficit en acide lipoïque dans la mitochondrie. Une équipe a proposé que le déficit en acide lipoïque puisse déréguler la synthèse d'ARNt mitochondriaux et donc la traduction mitochondriale de protéines chez la levure (Hiltunen et al. 2009), ce qui pourrait expliquer l'atteinte de la synthèse des sous-unités du complexe IV codées par le génome mitochondrial (COX1, COX2 et COX3). La synthèse mitochondriale des acides gras nécessite de l'acétyl-CoA pour produire l'acide octanoïque, précurseur de l'acide lipoïque, et, chez la levure, elle régulerait la traduction des protéines mitochondriales (Schonauer et al. 2008). En cas de défaut de lipoylation des protéines, le complexe PDHc n'est pas fonctionnel ce qui diminue la production d'acétyl-CoA. Chez les mammifères, l'interaction entre la synthèse mitochondriale des acides gras et la traduction mitochondriale des protéines n'a pas été mise en évidence (Kastaniotis et al. 2017). Plusieurs études vont à l'encontre de l'atteinte du complexe IV par diminution de la traduction mitochondriale des protéines. *In cellulo*, dans les cellules HeLa déplétées en ISCA1, il a été montré une diminution de COX4 (Torraco et al. 2018), qui n'est pas codée par l'ADNmt. De plus, lorsque j'ai supplémenté en acide lipoïque les fibroblastes des patients BOLA3, NFU1, IBA57 et ISCA2, ayant une atteinte de l'activité ou de l'intégrité du complexe IV, il n'y a pas eu d'augmentation de l'activité du complexe IV. Enfin, en plus du complexe IV, les complexes I et III ont également des sous-unités codées par l'ADNmt (sept sous-unités du complexe I et une sous-unité du complexe III). Si le déficit de synthèse de l'acide lipoïque entraînait une atteinte de la traduction mitochondriale, l'activité et ou l'intégrité du complexe III, comme pour le complexe IV, aurait été rapportée dans les déficits de la synthèse d'acide lipoïque ou de la voie de maturation des protéines Fe-S. Or, le complexe III n'est pas affecté dans ces pathologies, ce qui remet en cause cette hypothèse. Au cours de mon travail, j'ai également recherché si le déficit en acide lipoïque dans les cellules de patients pouvait entraîner une augmentation du niveau du stress oxydatif, qui affecterait le complexe IV. Les trois marqueurs de stress oxydatif cellulaire étudiés n'ont pas mis en évidence d'augmentation du stress oxydatif dans les fibroblastes à l'état basal ou après supplémentation en acide lipoïque. Mon étude suggère que le déficit en complexe IV n'est pas secondaire à un excès de stress oxydatif dans les fibroblastes, dans les conditions expérimentales testées. Des expérimentations sur l'intégrité des supercomplexes ou sur l'intégrité de plusieurs sous-unités du complexe IV codées par les génomes mitochondrial et nucléaire, dans des tissus de patients porteurs d'un

déficit ou dans des cellules HeLa déplétées en une protéine de la biogenèse des centres Fe-S, pourraient permettre de mieux comprendre les causes du dysfonctionnement du complexe IV observé.

2. Les protéines IBA57, ISCA1, ISCA2, BOLA3 et NFU1 coopèrent dans la voie de maturation des protéines [4Fe-4S]

L'étude de protéines mitochondriales [2Fe-2S] et [4Fe-4S] dans les cellules de patients avec un déficit en IBA57, ISCA1, ISCA2, BOLA3 ou NFU1 permet d'évaluer le positionnement de ces cinq protéines dans la voie de maturation des protéines Fe-S. La ferrochélatase et la protéine Rieske du complexe III sont les protéines [2Fe-2S] mitochondriales. Parmi les protéines [4Fe-4S], il y a l'aconitase mitochondriale, la LIAS, la sous-unité SDHB du complexe II (qui porte également un centre [2Fe-2S] et un centre [3Fe-4S]) et quatre sous-unités du complexe I de la CRM.

Concernant la maturation des protéines [2Fe-2S], différentes études rapportent des déficits de la protéine Rieske, *in cellulo* ou *in vivo*, mais les résultats sont controversés. *In cellulo*, une diminution de la protéine Rieske est observée dans des cellules HeLa déplétées en ISCA1 ou ISCA2 (Sheftel et al. 2012) bien que ce résultat ne soit pas retrouvé par une autre équipe dans les cellules HeLa déplétées en ISCA1 (Torraco et al. 2018). Chez la levure, une étude a suggéré le rôle de la protéine Iba57 dans l'insertion du centre [2Fe-2S] de la protéine Rieske (Sánchez et al. 2018). *In vivo*, la protéine Rieske a été retrouvée diminuée dans les cellules d'un patient BOLA3 et d'un patient NFU1 (Cameron et al. 2011) tandis qu'elle n'était pas diminuée dans celles de deux autres patients NFU1 (Ferrer-Cortès et al. 2012) ou de patients IBA57 (Ajit Bolar et al. 2013; Torraco et al. 2017). Dans mon étude, aucune diminution significative de la protéine Rieske n'est présente dans les fibroblastes des patients avec un déficit en IBA57, ISCA1, ISCA2 BOLA3 ou NFU1 et l'activité du complexe III était maintenue. L'ensemble de ces résultats suggère que ces protéines impliquées dans la maturation des protéines Fe-S ne sont pas dédiées à la maturation de la protéine Rieske chez les mammifères, qui pourrait être le rôle de la protéine LYRM7 (Sánchez et al. 2013). La diminution très modérée de la ferrochélatase que j'ai observée chez le patient ISCA1 n'a pas été retrouvée chez d'autres patients ISCA1 (Torraco et al. 2018) ni dans les cellules HeLa déplétées en ISCA1 (Sheftel et al. 2012). Une étude *in vivo* chez la souris ne montre pas non plus

d'effet du déficit en ISCA1 sur les protéines [2Fe-2S] (Beilschmidt et al. 2017). Bien que les protéines ISCA1 et ISCA2 puissent transférer un centre [2Fe-2S] à des protéines réceptrices *in vitro* (Beilschmidt et al. 2017), les protéines [2Fe-2S] ne seraient donc pas des cibles privilégiées d'ISCA1, ni de BOLA3, NFU1, d'IBA57 ou ISCA2 d'après mes résultats et ceux de la littérature (Beilschmidt & Puccio 2014; Alaimo et al. 2018)

Les protéines IBA57, ISCA1, ISCA2, BOLA3 et NFU1 sont donc impliquées, et probablement dédiées, à la maturation des protéines [4Fe-4S] mitochondriales mais l'ensemble des différentes études *in vitro* et chez des patients déficitaires en IBA57, ISCA1, ISCA2, BOLA3 et NFU1 n'ont pas encore précisé le positionnement de chacune de ces protéines dans cette voie. ISCA1, ISCA2 et IBA57 ont été, à l'origine, considérées comme des protéines partenaires dans la maturation des protéines à centre [4Fe-4S] (Sheftel et al. 2012). Depuis, plusieurs études ont proposé des positionnements différents de ces trois protéines. Une première équipe a montré que, *in vitro*, ISCA1 et ISCA2 pourraient former un hétérodimère et constituer un centre [4Fe-4S] à partir de deux centres [2Fe-2S] (un par monomère). Le centre [2Fe-2S] serait fourni par GLRX5, sans que la protéine IBA57 ne soit requise (Brancaccio et al. 2014; Banci et al. 2014). Cependant, une seconde équipe a proposé que seule ISCA2 pourrait interagir avec GLRX5, que ISCA1 aurait un rôle central dans la maturation des protéines [4Fe-4S], et qu'ISCA2 et IBA57 auraient plutôt un rôle secondaire dans cette étape de maturation, chez la souris (Beilschmidt et al. 2017). Une troisième étude *in vitro* récente confirmerait cette hypothèse en mettant en évidence la formation d'un complexe entre IBA57 et ISCA2, portant un centre [2Fe-2S] (Gourdoupis et al. 2018). Ce complexe pourrait être une alternative aux complexes ISCA1-ISCA1 ou ISCA1-ISCA2 pour la maturation des protéines [4Fe-4S]. Enfin, une quatrième étude a émis l'hypothèse qu'un homodimère ISCA1-ISCA1 ou un hétérodimère ISCA1-ISCA2 interagirait avec la protéine GLRX5 pour extraire son centre [2Fe-2S] puis former un centre [4Fe-4S] (Brancaccio et al. 2017). Il a été également proposé qu'ISCA1 interagirait avec NFU1 tandis qu'ISCA2 interagirait avec IBA57, pour le transfert du centre [4Fe-4S] aux protéines cibles (Beilschmidt et al. 2017). Cette dernière hypothèse est confortée par les résultats obtenus chez les patients ISCA2 et IBA57 (mon étude et (Torraco et al. 2017)) pour lesquels un déficit de l'une des deux protéines induit la diminution quantitative de

l'autre protéine. La protéine IBA57 n'est soit pas affectée dans le déficit en ISCA1 (Torraco et al. 2018) soit augmentée (mon étude). Cependant, d'autres résultats obtenus dans les cellules de patients pourraient contredire ce modèle car la protéine IBA57 est en quantité diminuée chez les patients déficitaires en NFU1 et BOLA3 dans mon étude et la protéine ISCA1 augmente dans les fibroblastes de certains patients IBA57 (Torraco et al. 2017) et ISCA2 (mon étude). L'ensemble de ces résultats obtenus *in vivo* suggèrent que la protéine IBA57 pourrait interagir, en plus d'avec ISCA2, avec NFU1 et/ou BOLA3. Quant à la protéine ISCA1, elle pourrait être surexprimée pour compenser la diminution de la protéine ISCA2, dans le déficit en ISCA2 ou en IBA57.

NFU1 et BOLA3 seraient des protéines partenaires dans le transfert de centres [4Fe-4S] depuis les protéines ISCA jusqu'aux protéines cibles. Le complexe formé par BOLA3 et NFU1 protégerait le centre [4Fe-4S] et BOLA3 pourrait ne pas être fonctionnelle sans la protéine NFU1, chez la levure (Melber et al. 2016). Ces données sont compatibles avec les résultats de mon étude dans laquelle la protéine NFU1 est diminuée dans les fibroblastes des patients BOLA3.

L'ensemble des études sur la fonctionnalité des protéines ISCA1, ISCA2, IBA57, NFU1 et BOLA3 met en évidence plusieurs interactions possibles entre elles (Melber et al. 2016; Beilschmidt et al. 2017), ce qui suggère la formation de plusieurs hétéro-complexes protéiques pour la maturation des protéines [4Fe-4S] (Figure 46). Il pourrait ainsi exister des voies principales et des voies alternatives qui s'adapteraient au type cellulaire, aux conditions cellulaires (prolifération cellulaire) ou au stress oxydatif (Gourdoupis et al. 2018). Il semble maintenant précisé que les protéines ISCA1 et ISCA2, sous forme d'homodimère ou d'hétérodimère, interviennent dans la formation du centre [4Fe-4S] à partir de deux dimères holo-GLRX5. Le centre [4Fe-4S] est ensuite transféré aux protéines cibles via le complexe formé par NFU1 et BOLA3. Le positionnement de la protéine IBA57 reste encore à être précisé (Figure 46). D'une part, IBA57 pourrait intervenir dans la maturation de protéines [2Fe-2S] et d'autre part elle semblerait aussi agir de concert avec la protéine ISCA2 ou coopérer avec NFU1 dans la maturation de certaines protéines [4Fe-4S] seulement. En effet, contrairement aux déficits en NFU1, BOLA3 ou ISCA2 pour lesquels la diminution de l'aconitase mitochondriale est bien caractérisée, dans le déficit en IBA57, cette diminution est variable (mon étude et (Sheftel et al. 2012; Torraco et al. 2017)). Ainsi,

son rôle dans la maturation de l'aconitase mitochondriale reste à être précisé. Afin d'aller plus loin dans la description moléculaire de ces étapes ultimes de maturation des protéines mitochondriales, des études *in vitro* complémentaires semblent requises. Elles consisteraient à rechercher tous les hétérodimères qui pourraient se former entre les protéines ISCA1, ISCA2, IBA57, BOLA3 et NFU1 en présence de sources de fer et de soufre. Une fois les hétérodimères identifiés, leur affinité pour les centres [2Fe-2S] et [4Fe-4S] serait étudiée. De manière similaire à ce qui a déjà été fait pour ISCA1 et ISCA2 (Beilschmidt et al. 2017), ces études pourraient être complétées par une recherche systématique des partenaires de BOLA3, IBA57 et NFU1 dans les cellules.

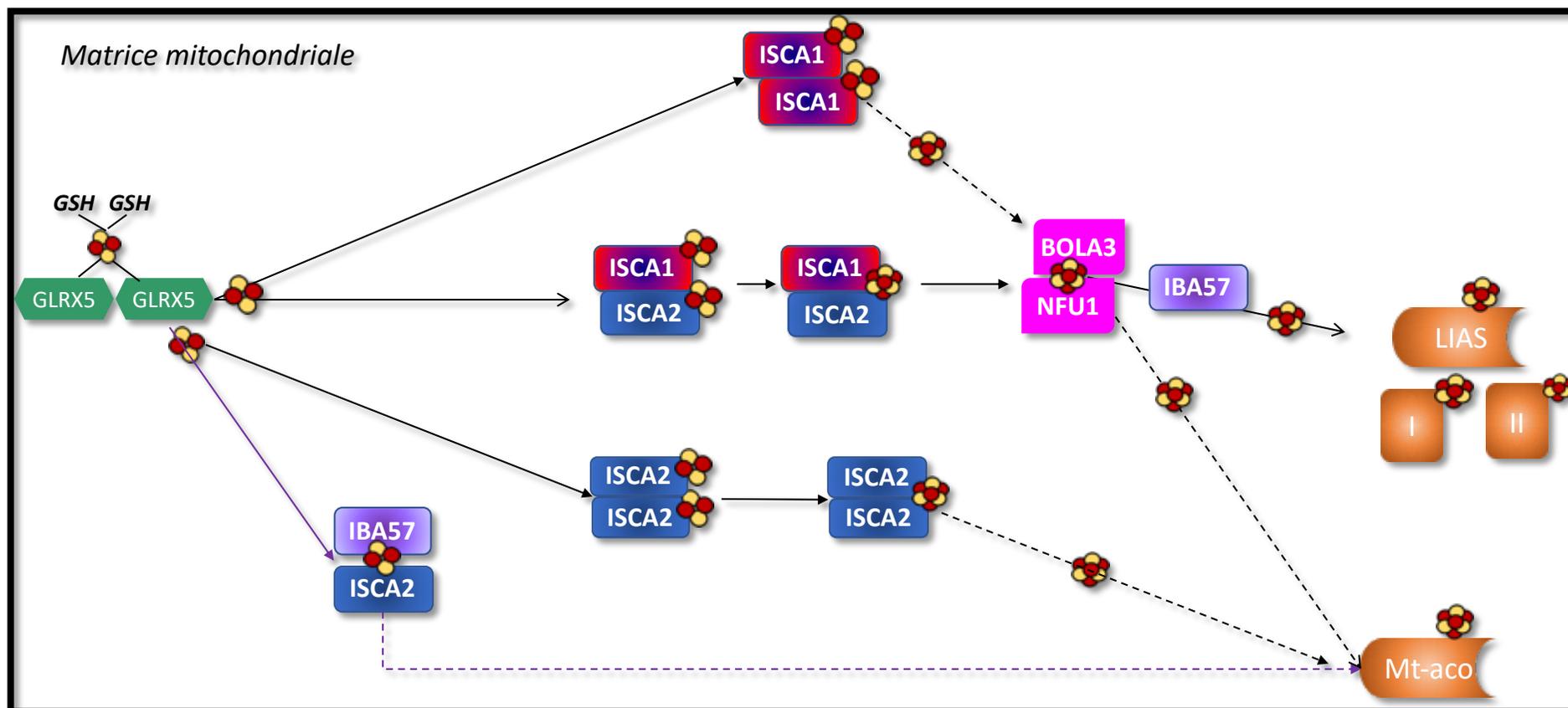


Figure 46 : Modèle proposant le positionnement des protéines IBA57, ISCA1, ISCA2, BOLA3 et NFU1 dans la maturation des protéines [4Fe-4S] mitochondriales.

Flèche pleine : voie métabolique dont les interactions protéiques ont été démontrées *in vitro*. Flèche pointillée : voie métabolique possible, sans interaction protéique démontrée. Flèche violette : voie métabolique alternative, limitée à certains tissus ou conditions oxydantes particulières. Forme orange : protéine à centre [4Fe-4S] (LIA5, sous-unités du complexe I et du complexe II de la CRM, et aconitase mitochondriale).

ANNEXES

A	Citrate synthase (CS) en nmol/min/mg prot				KGDHc en nmol/min/mg prot			
	Contrôles (n=3)	P4 (BOLA3)	P8 (NFU1)	P12 (ISCA2)	Contrôles (n=3)	P4 (BOLA3)	P8 (NFU1)	P12 (ISCA2)
LA 0,2 mg/L	148	91	85	226	9,3	1	0,9	0,1
LA 2 mg/L	132	92	125	101	7,0	1	1,0	0,5
LA 20 mg/L	174	92	88	191	1,7	0	0	0

B	Complexe I en nmol/min/mg prot				Complexe II en nmol/min/mg prot				Complexe III en nmol/min/mg prot				Complexe IV en nmol/min/mg prot			
	Contrôles (n=3)	P4 (BOLA3)	P8 (NFU1)	P12 (ISCA2)	Contrôles (n=3)	P4 (BOLA3)	P8 (NFU1)	P12 (ISCA2)	Contrôles (n=3)	P4 (BOLA3)	P8 (NFU1)	P12 (ISCA2)	Contrôles (n=3)	P4 (BOLA3)	P8 (NFU1)	P12 (ISCA2)
LA 0,2 mg/L	8,7	6,0	1,3	0,9	36	15	12	7	286	164	193	264	239	80	110	208
LA 2 mg/L	3,5	4,0	0,8	0,0	50	15	7	4	346	245	315	159	219	122	167	94
LA 20 mg/L	8,3	0,0	0,0	6,0	41	15	10	9	310	122	256	264	223	48	108	81

C	KGDHc/CS				Complexe I/CS				Complexe II/CS			
	Contrôles (n=3)	P4 (BOLA3)	P8 (NFU1)	P12 (ISCA2)	Contrôles (n=3)	P4 (BOLA3)	P8 (NFU1)	P12 (ISCA2)	Contrôles (n=3)	P4 (BOLA3)	P8 (NFU1)	P12 (ISCA2)
LA 0,2 mg/L	6%	1%	1%	0%	6%	7%	1%	0%	25%	16%	14%	3%
LA 2 mg/L	5%	1%	1%	0%	3%	4%	1%	0%	38%	16%	6%	3%
LA 20 mg/L	1%	0%	0%	0%	5%	0%	0%	3%	23%	16%	11%	5%

	Complexe III/CS				Complexe IV/CS			
	Contrôles (n=3)	P4 (BOLA3)	P8 (NFU1)	P12 (ISCA2)	Contrôles (n=3)	P4 (BOLA3)	P8 (NFU1)	P12 (ISCA2)
LA 0,2 mg/L	193%	180%	226%	117%	162%	88%	129%	92%
LA 2 mg/L	262%	266%	252%	157%	166%	133%	134%	93%
LA 20 mg/L	178%	133%	291%	138%	128%	52%	123%	42%

Annexe 1 : résultats complémentaires des figures 30 à 33 : résultats des activités enzymatiques des complexes de la CRM, de KGDHc et de la citrate synthase dans les fibroblastes immortalisés des patients BOLA3 (P4), NFU1 (P8) et ISCA2 (P12) cultivés avec de l'acide lipoïque à différentes concentrations.

A : activités enzymatiques de la citrate synthase (enzyme de contrôle) et de KGDHc (enzyme lipoylée) ; B : activités enzymatiques des complexes I, II, III et IV de la CRM ; C : activités enzymatiques de KGDHc et des complexes I à IV de la CRM rapportées à celle de la citrate synthase. Les résultats des fibroblastes contrôles sont la moyenne de trois expérimentations effectuées dans les cellules immortalisées de 3 contrôles différents.

		Citrate synthase (CS) (nmol/min/mg prot)	KGDHc (nmol/min/mg prot)	KGDHc/CS	Complexe I (nmol/min/mg prot)	Complexe I/CS	Complexe II (nmol/min/mg prot)	Complexe II/CS	Complexe III (nmol/min/mg prot)	Complexe III/CS	Complexe IV (nmol/min/mg prot)	Complexe IV/CS
	Valeurs de référence	39-69	3-8,7	7-14%		15-41%	12-19	20-32%	44-83	70-140%	48-85	100-140%
Contrôles (n=3)		55	8,2	15%	16	29%	16	29%	105	191%	79	144%
Patient ISCA1	Fibroblastes	59	5,0	8%	3	5%	11	19%	74	125%	65	111%
Patient IBA57		65	2,6	4%	NR		8	12%			NR	
Contrôles (n=3)		74	9,1	12%	NR		17	23%	105	142%	84	114%
Patient ISCA1	Myoblastes	56	4,9	9%	NR		14	24%	64	114%	62	110%
Patient IBA57		76	3,9	5%	NR		13	17%			NR	

Annexe 2 : Activités enzymatiques de la citrate synthase, de KGDHc et des complexes de la CRM dans les fibroblastes et les myoblastes du patient ISCA1 et du patient IBA57 (P10) et rapports activité enzymatique/activité enzymatique de la citrate synthase.

Les valeurs inférieures aux valeurs de références sont surlignées en orange.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbas, K., Riquier, S. & Drapier, J.C., 2013. Peroxiredoxins and sulfiredoxin at the crossroads of the NO and H₂O₂ signaling pathways. *Methods in Enzymology*, 527, pp.113–128.
- Acín-Pérez, R. et al., 2008. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Molecular cell*, 32(4), pp.529–39.
- Adam-Vizi, V., 2005. Production of Reactive Oxygen Species in Brain Mitochondria: Contribution by Electron Transport Chain and Non-Electron Transport Chain Sources. *Antioxidants & Redox Signaling*, 7(9–10), pp.1140–1149.
- Adam, A.C. et al., 2006. The Nfs1 interacting protein Isd11 has an essential role in Fe/S cluster biogenesis in mitochondria. *EMBO Journal*, 25(1), pp.174–183.
- Agar, J.N. et al., 2000. Modular organization and identification of a mononuclear iron-binding site within the NifU protein. *JBIC Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 5(2), pp.167–177.
- Ahting, U. et al., 2015. Clinical, biochemical, and genetic spectrum of seven patients with NFU1 deficiency. *Frontiers in genetics*, 6, p.123.
- Ajit Bolar, N. et al., 2013. Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene IBA57 causes severe myopathy and encephalopathy. *Human molecular genetics*, 22(13), pp.2590–602.
- Al-Hassnan, Z.N. et al., 2015. ISCA2 mutation causes infantile neurodegenerative mitochondrial disorder. *Journal of medical genetics*, 52(3), pp.186–94.
- Alaimo, J.T. et al., 2018. Loss-of-function mutations in ISCA2 disrupt 4Fe-4S cluster machinery and cause a fatal leukodystrophy with hyperglycinemia and mtDNA depletion. *Human Mutation*, 39(4), pp.537–549.
- Alfadhel, M. et al., 2018. Further delineation of the phenotypic spectrum of ISCA2 defect: A report of ten new cases. *European Journal of Paediatric Neurology*, 22(1), pp.46–55.
- Alston, C.L. et al., 2017. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *Journal of Pathology*, 241(2), pp.236–250.
- Archibald, J.M., 2015. Endosymbiosis and Eukaryotic Cell Evolution. *Current Biology*, 25, pp.R911–R921.
- Arivazhagan, P., Ramanathan, K. & Panneerselvam, C., 2001. Effect of DL-alpha-lipoic acid on mitochondrial enzymes in aged rats. *Chemico-biological interactions*, 138(2), pp.189–98.
- Armstrong, C.T., Anderson, J.L.R. & Denton, R.M., 2014. Studies on the regulation of the human E1 subunit of the 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, including the identification of a novel calcium-binding site. *Biochemical Journal*, 459(2), pp.369–381.
- Baker, P.R. et al., 2014. Variant non ketotic hyperglycinemia is caused by mutations in LIAS, BOLA3 and the novel gene GLRX5. *Brain: a journal of neurology*, 137(Pt 2), pp.366–79.

- Banci, L. et al., 2014. [2Fe-2S] cluster transfer in iron-sulfur protein biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(17), pp.6203–8.
- Barupala, D.P. et al., 2016. Synthesis, delivery and regulation of eukaryotic heme and Fe-S cluster cofactors. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 592, pp.60–75.
- Beilschmidt, L.K. et al., 2017. ISCA1 is essential for mitochondrial Fe4S4 biogenesis in vivo. *Nature Communications*, 8(May), p.15124.
- Beilschmidt, L.K. & Puccio, H.M., 2014. Mammalian Fe-S cluster biogenesis and its implication in disease. *Biochimie*, 100, pp.48–60.
- Belhadj Slimen, I. et al., 2014. Reactive oxygen species, heat stress and oxidative-induced mitochondrial damage. A review. *International Journal of Hyperthermia*, 30(7), pp.513–523.
- Boniecki, M.T. et al., 2017. Structure and functional dynamics of the mitochondrial Fe/S cluster synthesis complex. *Nature Communications*, 8(1), p.1287.
- Brancaccio, D. et al., 2017. [4Fe-4S] cluster assembly in mitochondria and its impairment by copper. *Journal of the American Chemical Society*, 139(2), pp.719–730.
- Brancaccio, D. et al., 2014. Formation of [4Fe-4S] clusters in the mitochondrial iron-sulfur cluster assembly machinery. *Journal of the American Chemical Society*, 136(46), pp.16240–50.
- Braymer, J.J. & Lill, R., 2017. Iron–sulfur cluster biogenesis and trafficking in mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 292(31), pp.12754–12763.
- Bricker, D.K. et al., 2012. A mitochondrial pyruvate carrier required for pyruvate uptake in yeast, Drosophila, and humans. *Science (New York, N. Y.)*, 337(6090), pp.96–100.
- Brody, S. et al., 1997. Mitochondrial acyl carrier protein is involved in lipoic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters*, 408(2), pp.217–20.
- Bych, K. et al., 2008. The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *The EMBO journal*, 27(12), pp.1736–46.
- Cai, K. et al., 2017. Human Mitochondrial Ferredoxin 1 (FDX1) and Ferredoxin 2 (FDX2) Both Bind Cysteine Desulfurase and Donate Electrons for Iron-Sulfur Cluster Biosynthesis. *Biochemistry*, 56(3), pp.487–499.
- Cai, K. et al., 2018. Interactions of iron-bound frataxin with ISCU and ferredoxin on the cysteine desulfurase complex leading to Fe-S cluster assembly. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 183, pp.107-16
- Cai, K. et al., 2016. Structural/Functional Properties of Human NFU1, an Intermediate [4Fe-4S] Carrier in Human Mitochondrial Iron-Sulfur Cluster Biogenesis. *Structure*, 24(12), pp.2080–91.
- Calvo, S.E. et al., 2010. High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency. *Nature genetics*, 42(10), pp.851–8.

- Camaschella, C. et al., 2007. The human counterpart of zebrafish shiraz shows sideroblastic-like microcytic anemia and iron overload. *Blood*, 110(4), pp.1353–58.
- Cameron, J.M. 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. *American journal of human genetics*, 89(4), pp.486–95.
- Cecchini, G., 2003. Function and Structure of Complex II of the Respiratory Chain. *Annual Review of Biochemistry*, 72(1), pp.77–109.
- Chacinska, A. et al., 2009. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*, 138(4), pp.628–44.
- Chance, B., Sies, H. & Boveris, A., 1979. Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiological Reviews*, 59(3), pp.527–605.
- Chng, H.T. et al., 2009. Distribution study of orally administered lipoic acid in rat brain tissues. *Brain Research*, 1251, pp.80–6.
- Christensen, Q.H. & Cronan, J.E., 2010. Lipoic Acid Synthesis: A New Family of Octanoyltransferases Generally Annotated as Lipoate Protein Ligases. *Biochemistry*, 49(46), pp.10024–36.
- Ciofi-Baffoni, S., Nasta, V. & Banci, L., 2018. Protein networks in the maturation of human iron-sulfur proteins. *Metallomics*, 10(1), pp.49–72.
- Colabroy, K.L. & Begley, T.P., 2005. Tryptophan Catabolism: Identification and Characterization of a New Degradative Pathway. *Journal of bacteriology*, 187(22), pp.7866–9.
- Colin, F. et al., 2013. Mammalian Frataxin Controls Sulfur Production and Iron Entry during de Novo Fe₄S₄ Cluster Assembly. *Journal of the American Chemical Society*, 135(2), pp.733–40.
- Couturier, J. et al., 2015. The roles of glutaredoxins ligating Fe-S clusters: Sensing, transfer or repair functions? *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(6), pp.1513–27.
- Cózar-Castellano, I. et al., 2004. hIscA: a protein implicated in the biogenesis of iron-sulfur clusters. *Biochimica et biophysica acta*, 1700(2), pp.179–88.
- Crack, J.C. & Le Brun, N.E., 2017. Redox-sensing iron-sulfur cluster regulators. *Antioxidants & Redox Signaling*, p.ars.2017.7369.
- Cronan, J.E., 2014. The structure of lipoyl synthase, a remarkable enzyme that performs the last step of an extraordinary biosynthetic pathway. *The Biochemical journal*, 464(1), pp.e1-3.
- Cronan, J.E., Zhao, X. & Jiang, Y., 2005. Function, Attachment and Synthesis of Lipoic Acid in Escherichia coli. In *Advances in microbial physiology*. pp. 103–46.
- Dallabona, C. et al., 2016. LYRM7 mutations cause a multifocal cavitating leukoencephalopathy with distinct MRI appearance. *Brain*, 139(3), pp.782–94.
- Danhauser, K. et al., 2012. DHTKD1 mutations cause 2-amino adipic and 2-oxoadipic aciduria. *American Journal of Human Genetics*, 91(6), pp.1082–7.

- Debray, F.-G. et al., 2015. Mutation of the iron-sulfur cluster assembly gene IBA57 causes fatal infantile leukodystrophy. *Journal of inherited metabolic disease*, 38(6), pp.1147–53.
- Dizdaroglu, M. & Jaruga, P., 2012. Mechanisms of free radical-induced damage to DNA. *Free Radical Research*, 46(4), pp.382–419.
- Dutkiewicz, R. & Nowak, M., 2018. Molecular chaperones involved in mitochondrial iron–sulfur protein biogenesis. *Journal of Biological Inorganic Chemistry*, 23(4), pp.569–79.
- Fang, J.-K. et al., 2007. Site specific phosphorylation of cytochrome c oxidase subunits I, IV1 and Vb in rabbit hearts subjected to ischemia/reperfusion. *FEBS letters*, 581(7), pp.1302–10.
- Farhan, S.M.K. et al., 2014. Exome sequencing identifies NFS1 deficiency in a novel Fe-S cluster disease, infantile mitochondrial complex II/III deficiency. *Molecular Genetics & Genomic Medicine*, 2(1), pp.73–80.
- Fedorova, M., Bollineni, R.C. & Hoffmann, R., 2014. Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies. *Mass Spectrometry Reviews*, 33(2), pp.79–97.
- Ferecatu, I. et al., 2018. Dysfunction in the mitochondrial Fe-S assembly machinery leads to formation of the chemoresistant truncated VDAC1 isoform without HIF-1 α activation B. Mari, ed. *PLOS ONE*, 13(3), p.e0194782.
- Ferecatu, I. et al., 2014. The diabetes drug target MitoNEET governs a novel trafficking pathway to rebuild an Fe-S cluster into cytosolic aconitase/iron regulatory protein 1. *The Journal of biological chemistry*, 289(41), pp.28070–86.
- Fernandez-V, Izarra, E. & Zeviani, M., 2018. Mitochondrial complex III Rieske Fe-S protein processing and assembly. *Cell Cycle*, 17(6), pp.681–7.
- Ferrer-Cortès, X. et al., 2016. A leaky splicing mutation in NFU1 is associated with a particular biochemical phenotype. Consequences for the diagnosis. *Mitochondrion*, 26, pp.72–80.
- Ferrer-Cortès, X. et al., 2012. Protein expression profiles in patients carrying NFU1 mutations. Contribution to the pathophysiology of the disease. *Journal of inherited metabolic disease*, 36(5), pp.841–7.
- Fuss, J.O. et al., 2015. Emerging critical roles of Fe-S clusters in DNA replication and repair. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(6), pp.1253–71.
- Galy, B. et al., 2010. Iron regulatory proteins secure mitochondrial iron sufficiency and function. *Cell Metabolism*, 12(2), pp.194–201.
- Gelling, C. et al., 2008. Mitochondrial Iba57p is required for Fe/S cluster formation on aconitase and activation of radical SAM enzymes. *Molecular and cellular biology*, 28(5), pp.1851–61.
- Genova, M.L. et al., 2008. Is supercomplex organization of the respiratory chain required for optimal electron transfer activity? *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1777(7–8), pp.740–6.
- Genova, M.L. & Lenaz, G., 2014. Functional role of mitochondrial respiratory supercomplexes. *Biochimica et biophysica acta*, 1837(4), pp.427–43.

- Ghezzi, D. et al., 2009. SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nature Genetics*, 41(6), pp.654–6.
- Gnandt, E. et al., 2016. The multitude of iron–sulfur clusters in respiratory complex I. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1857(8), pp.1068–72.
- Golinelli-Cohen, M.-P. & Bouton, C., 2017. Fe-S Proteins Acting as Redox Switch: New Key Actors of Cellular Adaptive Responses. *Current Chemical Biology*, 11, pp.1–19.
- Gourdoupis, S. et al., 2018. IBA57 Recruits ISCA2 to Form a [2Fe-2S] Cluster-Mediated Complex. *Journal of the American Chemical Society*, 140(43), pp.14401–12.
- Green, D.E. et al., 1995. Purification and properties of the lipoate protein ligase of *Escherichia coli*. *The Biochemical journal*, 309, pp.853–62.
- Gu, J. et al., 2016. The architecture of the mammalian respirasome. *Nature*, 537(7622), pp.1–16.
- Guerrero-Castillo, S. et al., 2017. The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metabolism*, 25(1), pp.128–39.
- Guo, J. et al., 2017. Reengineering of the human pyruvate dehydrogenase complex: from disintegration to highly active agglomerates. *The Biochemical journal*, 474(5), pp.865–75.
- Guo, R. et al., 2017. Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2. *Cell*, 170(6), p.1247–1257.e12.
- Gurgel-Giannetti, J. et al., 2018. A novel complex neurological phenotype due to a homozygous mutation in FDX2. *Brain*, 141(8), pp.2289–98.
- Haack, T.B. et al., 2013. Homozygous missense mutation in BOLA3 causes multiple mitochondrial dysfunctions syndrome in two siblings. *Journal of inherited metabolic disease*, 36(1), pp.55–62.
- Habarou, F. et al., 2017. Biallelic mutations in LIPT2 cause a mitochondrial lipoylation defect associated with severe neonatal encephalopathy. *American journal of human genetics*, 101(2), pp.283–90.
- Hamanaka, K. et al., 2018. Expanding the phenotype of IBA57 mutations: related leukodystrophy can remain asymptomatic. *Journal of Human Genetics*, 63, pp.1223–9.
- Hempel, M. et al., 2017. LYRM7 - associated complex III deficiency: A clinical, molecular genetic, MR tomographic, and biochemical study. *Mitochondrion*, 37, pp.55–61.
- Hezaveh, S., Zeng, A.-P. & Jandt, U., 2018. Full Enzyme Complex Simulation: Interactions in Human Pyruvate Dehydrogenase Complex. *Journal of chemical information and modeling*, 58(2), pp.362–9.
- Hiltunen, J.K. et al., 2009. Mitochondrial fatty acid synthesis type II: more than just fatty acids. *The Journal of biological chemistry*, 284(14), pp.9011–5.
- Hirst, J., 2013. Mitochondrial complex I. *Annual review of biochemistry*, 82, pp.551–75.

- Imlay, J.A., 2006. Iron-sulphur clusters and the problem with oxygen. *Molecular Microbiology*, 59(4), pp.1073–82.
- Invernizzi, F. et al., 2013. A Homozygous Mutation in LYRM7/MZM1L Associated with Early Onset Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Severe Reduction of Mitochondrial Complex III Activity. *Human Mutation*, 34(12), pp.1619–22.
- Invernizzi, F. et al., 2014. Cavitating leukoencephalopathy with multiple mitochondrial dysfunction syndrome and NFU1 mutations. *Frontiers in Genetics*, 5(NOV), p.412.
- Ishiyama, A. et al., 2017. IBA57 mutations abrogate iron-sulfur cluster assembly leading to cavitating leukoencephalopathy. *Neurology Genetics*, 3(5), p.e184.
- Iwata, S. et al., 1998. Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome bc 1 Complex. *Science*, 281(5373), pp.64–71.
- Jeong, W. et al., 2012. Role of sulfiredoxin as a regulator of peroxiredoxin function and regulation of its expression. *Free Radical Biology and Medicine*, 53(3), pp.447–56.
- Jin, D. et al., 2017. Novel NFU1 Variants Induced MMDS Behaved as Special Leukodystrophy in Chinese Sufferers. *Journal of Molecular Neuroscience*, 62(2), pp.255–61.
- Johnson, D.C. et al., 2005. Structure, function, and formation of biological iron-sulfur clusters. *Annual review of biochemistry*, 74, pp.247–81.
- Kadenbach, B. & Hüttemann, M., 2015. The subunit composition and function of mammalian cytochrome c oxidase. *Mitochondrion*, 24, pp.64–76.
- Kanamaru, Y. et al., 2012. The Phosphorylation-Dependent Regulation of Mitochondrial Proteins in Stress Responses. *Journal of Signal Transduction*, 2012, pp.1–12.
- Kastaniotis, A.J. et al., 2017. Mitochondrial fatty acid synthesis, fatty acids and mitochondrial physiology. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1862(1), pp.39–48.
- Kaut, A. et al., 2000. Isa1p is a component of the mitochondrial machinery for maturation of cellular iron-sulfur proteins and requires conserved cysteine residues for function. *Journal of Biological Chemistry*, 275(21), pp.15955–61.
- Kevelam, S.H. et al., 2013. NUBPL mutations in patients with complex I deficiency and a distinct MRI pattern. *Neurology*, 80(17), pp.1577–83.
- Khan, M.I. et al., 2011. Simultaneous Determination of the Endogenous Free α -Lipoic Acid and Dihydrolipoic Acid in Human Plasma and Erythrocytes by RP-HPLC with Electrochemical Detection. *Chromatographia*, 73(9–10), pp.929–39.
- Kispal, G. et al., 1999. The mitochondrial proteins Atm1p and Nfs1p are essential for biogenesis of cytosolic Fe/S proteins. *The EMBO journal*, 18(14), pp.3981–9.
- Kowaltowski, A.J. et al., 2009. Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radical Biology and Medicine*, 47(4), pp.333–43.
- Kremer, L.S. et al., 2016. Severe respiratory complex III defect prevents liver adaptation to prolonged fasting. *Journal of Hepatology*, 65(2), pp.377–85.

- Kure, S. et al., 2001. Chromosomal localization, structure, single-nucleotide polymorphisms, and expression of the human H-protein gene of the glycine cleavage system (GCSH), a candidate gene for nonketotic hyperglycinemia. *Journal of Human Genetics*, 46(7), pp.378–84.
- Lanciano, P. et al., 2013. Molecular mechanisms of superoxide production by complex III: A bacterial versus human mitochondrial comparative case study. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1827(11–12), pp.1332–9.
- Land, T. & Rouault, T.A., 1998. Targeting of a human iron-sulfur cluster assembly enzyme, nifs, to different subcellular compartments is regulated through alternative AUG utilization. *Molecular Cell*, 2(6), pp.807–15.
- Landgraf, B.J., McCarthy, E.L. & Booker, S.J., 2016. Radical S-Adenosylmethionine Enzymes in Human Health and Disease. *Annual review of biochemistry*, 85, pp.485–514.
- Lane, D.J.R., Merlot, A.M. & Richardson, D.R., 2014. The lure of a LYR: The logistics of iron sulfur cluster delivery. *Cell metabolism*, 19(3), pp.348–50.
- Lauble, H. et al., 1992. Crystal structures of aconitase with isocitrate and nitroisocitrate bound. *Biochemistry*, 31(10), pp.2735–48.
- Laurent, C. et al., 2013. Dramatic Increase in Oxidative Stress in Carbon-Irradiated Normal Human Skin Fibroblasts. *PLoS ONE*, 8(12), p.85158.
- Lenaz, G. & Genova, M.L., 2010. Structure and Organization of Mitochondrial Respiratory Complexes: A New Understanding of an Old Subject. *Antioxidants & Redox Signaling*, 12(8), pp.961–1008.
- Li, J. & Cowan, J.A., 2015. Glutathione-coordinated [2Fe–2S] cluster: a viable physiological substrate for mitochondrial ABCB7 transport. *Chemical Communications*, 51(12), pp.2253–5.
- Lill, R. et al., 2006. Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes. *Biochimica et biophysica acta*, 1763(7), pp.652–67.
- Lill, R. et al., 2012. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochimica et biophysica acta*, 1823(9), pp.1491–508.
- Lim, S.C. et al., 2013. Mutations in LYRM4, encoding iron-sulfur cluster biogenesis factor ISD11, cause deficiency of multiple respiratory chain complexes. *Human molecular genetics*, 22(22), pp.4460–73.
- Lin, M.T. & Beal, M.F., 2006. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 443(7113), pp.787–95.
- Liu, G. et al., 2016. Functional Analysis of GLRX5 Mutants Reveals Distinct Functionalities of GLRX5 Protein. *Journal of cellular biochemistry*, 117(1), pp.207–17.
- Liu, G. et al., 2014. Heterozygous missense mutations in the GLRX5 gene cause sideroblastic anemia in a Chinese patient. *Blood*, 124(17), pp.2750–1.
- Liu, M. et al., 2018. Phenotypic spectrum of mutations in IBA57, a candidate gene for cavitating leukoencephalopathy. *Clinical Genetics*, 93(2), pp.235–241.

- Liu, Y., Fiskum, G. & Schubert, D., 2002. Generation of reactive oxygen species by the mitochondrial electron transport chain. *Journal of neurochemistry*, 80(5), pp.780–7.
- Lossos, A. et al., 2015. Fe/S protein assembly gene IBA57 mutation causes hereditary spastic paraplegia. *Neurology*, 84(7), pp.659–67.
- Maio, N. et al., 2014. Cochaperone binding to LYR motifs confers specificity of iron sulfur cluster delivery. *Cell metabolism*, 19(3), pp.445–57.
- Maio, N. et al., 2016. Disease-causing SDHAF1 mutations impair transfer of Fe-S clusters to SDHB. *Cell Metabolism*, 23(2), pp.292–302.
- Maio, N. & Rouault, T.A., 2015. Iron-sulfur cluster biogenesis in mammalian cells: New insights into the molecular mechanisms of cluster delivery. *Biochimica et biophysica acta*, 1853(6), pp.1493–512.
- Mayr, J.A. et al., 2014. Lipoic acid biosynthesis defects. *Journal of inherited metabolic disease*, 37(4), pp.553–63.
- Mayr, J.A. et al., 2011. Lipoic acid synthetase deficiency causes neonatal-onset epilepsy, defective mitochondrial energy metabolism, and glycine elevation. *American journal of human genetics*, 89(6), pp.792–7.
- McCarthy, E.L. & Booker, S.J., 2017. Destruction and reformation of an iron-sulfur cluster during catalysis by lipoyl synthase. *Science*, 358(6361), pp.373–7.
- Medlock, A.E. et al., 2015. Identification of the Mitochondrial Heme Metabolism Complex M. Liesa, ed. *PLOS ONE*, 10(8), p.e0135896.
- Melber, A. et al., 2016. Role of Nfu1 and Bol3 in iron-sulfur cluster transfer to mitochondrial clients. *eLife*, 5(AUGUST), p.e15991.
- Michel, F. et al., 2008. Biomarqueurs de la peroxydation lipidique: Aspects analytiques. *Annales de Biologie Clinique*, 66(6), pp.605–20.
- Mochel, F. & Haller, R.G., 2009. *Myopathy with Deficiency of ISCU*,
- Mühlenhoff, U. et al., 2003. Components involved in assembly and dislocation of iron–sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *The EMBO Journal*, 22(18), pp.4815–25.
- Murphy, M.P., 2009. How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochemical Journal*, 417(1), pp.1–13.
- Nasta, V. et al., 2017. Structural insights into the molecular function of human [2Fe-2S] BOLA1-GRX5 and [2Fe-2S] BOLA3-GRX5 complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1861(8), pp.2119–31.
- Navarro-Sastre, A. et al., 2011. A fatal mitochondrial disease is associated with defective NFU1 function in the maturation of a subset of mitochondrial Fe-S proteins. *American journal of human genetics*, 89(5), pp.656–67.
- Nickel, A., Kohlhaas, M. & Maack, C., 2014. Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 73, pp.26–33.
- Nilsson, R. et al., 2009. Discovery of genes essential for heme biosynthesis through large-scale gene expression analysis. *Cell metabolism*, 10(2), pp.119–30.

- Nishioka, M. et al., 2018. An infant case of diffuse cerebrospinal lesions and cardiomyopathy caused by a BOLA3 mutation. *Brain and Development*, 40(6), pp.484–8.
- Nizon, M. et al., 2014. Leukoencephalopathy with cysts and hyperglycinemia may result from NFU1 deficiency. *Mitochondrion*, 15, pp.59–64.
- Obis, È. et al., 2014. Frataxin deficiency in neonatal rat ventricular myocytes targets mitochondria and lipid metabolism. *Free Radical Biology and Medicine*, 73, pp.21–33.
- Packer, L. & Cadenas, E., 2010. Lipoic acid: energy metabolism and redox regulation of transcription and cell signaling. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 48(1), pp.26–32.
- Packer, L., Witt, E.H. & Tritschler, H.J., 1995. Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radical Biology and Medicine*, 19(2), pp.227–50.
- Pandolfo, M., 2008. Friedreich Ataxia. *Archives of neurology*, 65(10), pp.1297–303.
- Paradkar, P.N. et al., 2009. Regulation of mitochondrial iron import through differential turnover of mitoferrin 1 and mitoferrin 2. *Molecular and cellular biology*, 29(4), pp.1007–16.
- Parent, A. et al., 2015. Mammalian frataxin directly enhances sulfur transfer of NFS1 persulfide to both ISCU and free thiols. *Nature Communications*, 6.
- Patel, M.S. et al., 2014. The pyruvate dehydrogenase complexes: Structure-based function and regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 289(24), pp.16615–23.
- Paul, V.D. & Lill, R., 2014. SnapShot: eukaryotic Fe-S protein biogenesis. *Cell metabolism*, 20(2), p.384–384.e1.
- Pelzer, W. et al., 2000. Mitochondrial Isa2p plays a crucial role in the maturation of cellular iron-sulfur proteins. *FEBS Letters*, 476(3), pp.134–9.
- Rhee, S.G., 2016. Overview on Peroxiredoxin. *Molecules and Cells*, 39(1), pp.1–5.
- Rich, P.R., 2017. Mitochondrial cytochrome c oxidase: catalysis, coupling and controversies. *Biochemical Society Transactions*, 45(3), pp.813–29.
- Robin, J.D. et al., 2015. Isolation and immortalization of patient-derived cell lines from muscle biopsy for disease modeling. *Journal of visualized experiments: JoVE*, (95), p.52307.
- Rochette, L. et al., 2013. Direct and indirect antioxidant properties of α -lipoic acid and therapeutic potential. *Molecular Nutrition & Food Research*, 57(1), pp.114–25.
- Rouault, T.A., 2012. Biogenesis of iron-sulfur clusters in mammalian cells: new insights and relevance to human disease. *Disease models & mechanisms*, 5(2), pp.155–64.
- Royer-Bertrand, B. et al., 2015. Mutations in the heat-shock protein A9 (HSPA9) gene cause the EVEN-PLUS syndrome of congenital malformations and skeletal dysplasia. *Scientific Reports*, 5, p.17154.
- Rudolf, J. et al., 2006. The DNA Repair Helicases XPD and FancJ Have Essential Iron-Sulfur Domains. *Molecular Cell*, 23(6), pp.801–8.

- Rustin, P. et al., 1994. Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 228(1), pp.35–51.
- Sánchez, E. et al., 2013. LYRM7/MZM1L is a UQCRCF1 chaperone involved in the last steps of mitochondrial Complex III assembly in human cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1827(3), pp.285–93.
- Sánchez, L.A. et al., 2018. Iba57p participates in maturation of a [2Fe-2S]-cluster Rieske protein and in formation of supercomplexes III/IV of *Saccharomyces cerevisiae* electron transport chain. *Mitochondrion*.
- Sato, K. et al., 1991. Glycine cleavage system in astrocytes. *Brain Research*, 567(1), pp.64–70.
- Schägger, H. & Pfeiffer, K., 2001. The Ratio of Oxidative Phosphorylation Complexes I-V in Bovine Heart Mitochondria and the Composition of Respiratory Chain Supercomplexes. *Journal of Biological Chemistry*, 276(41), pp.37861–7.
- Schilke, B. et al., 1999. Evidence for a conserved system for iron metabolism in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(18), pp.10206–11.
- Schmitz-Abe, K. et al., 2015. Congenital sideroblastic anemia due to mutations in the mitochondrial HSP70 homologue HSPA9. *Blood*, 126(25), pp.2734–8.
- Schonauer, M.S. et al., 2008. Intersection of RNA Processing and the Type II Fatty Acid Synthesis Pathway in Yeast Mitochondria. *Molecular and Cellular Biology*, 28(21), pp.6646–57.
- Schonauer, M.S. et al., 2009. Lipoic acid synthesis and attachment in yeast mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 284(35), pp.23234–42.
- Seyda, A. et al., 2001. A novel syndrome affecting multiple mitochondrial functions, located by microcell-mediated transfer to chromosome 2p14-2p13. *American journal of human genetics*, 68(2), pp.386–96.
- Shay, K.P. et al., 2009. Alpha-lipoic acid as a dietary supplement: Molecular mechanisms and therapeutic potential. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1790(10), pp.1149–60.
- Sheftel, A., Stehling, O. & Lill, R., 2010. Iron-sulfur proteins in health and disease. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 21(5), pp.302–14.
- Sheftel, A.D. et al., 2009. Human ind1, an iron-sulfur cluster assembly factor for respiratory complex I. *Molecular and cellular biology*, 29(22), pp.6059–73.
- Sheftel, A.D. et al., 2010. Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(26), pp.11775–11780.
- Sheftel, A.D. et al., 2012. The human mitochondrial ISCA1, ISCA2, and IBA57 proteins are required for [4Fe-4S] protein maturation. *Molecular biology of the cell*, 23(7), pp.1157–66.
- Shi, C. et al., 2016. α -Lipoic acid protects against the cytotoxicity and oxidative stress induced by cadmium in HepG2 cells through regeneration of glutathione by glutathione reductase via Nrf2/ARE signaling pathway. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 45, pp.274–81.

- Shi, Y. et al., 2012. Both human ferredoxins 1 and 2 and ferredoxin reductase are important for iron-sulfur cluster biogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1823(2), pp.484–92.
- Shukla, A. et al., 2017. Homozygous p.(Glu87Lys) variant in ISCA1 is associated with a multiple mitochondrial dysfunctions syndrome. *Journal of Human Genetics*, 62(7), pp.723–7.
- Shukla, A., Kaur, P. & Girisha, K., 2018. Report of the Third Family with Multiple Mitochondrial Dysfunctions Syndrome 5 Caused by the Founder Variant p.(Glu87Lys) in ISCA1. *Journal of Pediatric Genetics*, 07(03), pp.130–3.
- Solomonson, A. & DeBerardinis, R.J., 2018. Lipoic acid metabolism and mitochondrial redox regulation. *Journal of Biological Chemistry*, 293(20), pp.7522–30.
- Soreze, Y. et al., 2013. Mutations in human lipoyltransferase gene LIPT1 cause a Leigh disease with secondary deficiency for pyruvate and alpha-ketoglutarate dehydrogenase. *Orphanet journal of rare diseases*, 8, p.192.
- Spiegel, R. et al., 2014. Deleterious mutation in FDX1L gene is associated with a novel mitochondrial muscle myopathy. *European journal of human genetics: EJHG*, 22(7), pp.902–6.
- Srinivasan, S. et al., 2013. Oxidative stress induced mitochondrial protein kinase A mediates cytochrome c oxidase dysfunction. *PLoS One*, 8(10), p.e77129.
- Srinivasan, V., Pierik, A.J. & Lill, R., 2014. Crystal structures of nucleotide-free and glutathione-bound mitochondrial ABC transporter Atm1. *Science*, 343(6175), pp.1137–40.
- Stroud, D.A. et al., 2016. Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex i. *Nature*, 538(7623), pp.123–6.
- Stryer, L., Berg, J. & Tymoczko, J., 2003. *Biochimie*, cinquième édition. Flammarion.
- Suh, J.H. et al., 2004. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(10), pp.3381–6.
- Sun, F. et al., 2005. Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein Complex II. *Cell*, 121(7), pp.1043–57.
- Taanman, J.W., 1997. Human cytochrome c oxidase: structure, function, and deficiency. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 29(2), pp.151–63.
- Taché, V. et al., 2016. Lipoyltransferase 1 Gene Defect Resulting in Fatal Lactic Acidosis in Two Siblings. *Case Reports in Obstetrics and Gynecology*, 2016, pp.1–4.
- Tirosh, O. et al., 2003. Redox regulation of mitochondrial permeability transition: Effects of uncoupler, lipoic acid and its positively charged analog LA-plus and selenium. In *BioFactors*. pp. 297–306.
- Toldo, I. et al., 2018. Neonatal mitochondrial leukoencephalopathy with brain and spinal involvement and high lactate: expanding the phenotype of ISCA2 gene mutations. *Metabolic Brain Disease*, 33, pp.805–12.
- Tonduti, D. et al., 2015. New spastic paraplegia phenotype associated to mutation of NFU1. *Orphanet journal of rare diseases*, 10, p.13.

- Tong, W.-H. et al., 2003. Subcellular compartmentalization of human Nfu, an iron-sulfur cluster scaffold protein, and its ability to assemble a [4Fe-4S] cluster. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(17), pp.9762–7.
- Torraco, A. et al., 2018. ISCA1 Mutation In A Patient With Infantile-Onset Leukodystrophy Causes Defects In Mitochondrial [4Fe-4S] Proteins. *Human Molecular Genetics*, 27(15), pp.2739–54.
- Torraco, A. et al., 2017. Novel mutations in IBA57 are associated with leukodystrophy and variable clinical phenotypes. *Journal of Neurology*, 264(1), pp.102–11.
- Tort, F. et al., 2014. Mutations in the lipoyltransferase LIPT1 gene cause a fatal disease associated with a specific lipoylation defect of the 2-ketoacid dehydrogenase complexes. *Human molecular genetics*, 23(7), pp.1907–15.
- Tsurusaki, Y. et al., 2015. Novel compound heterozygous LIAS mutations cause glycine encephalopathy. *Journal of Human Genetics*, 60(10), pp.631–5.
- Uzarska, M.A. et al., 2016. Mitochondrial Bol1 and Bol3 function as assembly factors for specific iron-sulfur proteins. *eLife*, 5.
- Uzarska, M.A. et al., 2013. The mitochondrial Hsp70 chaperone Ssq1 facilitates Fe/S cluster transfer from Isu1 to Grx5 by complex formation. *Molecular biology of the cell*, 24(12), pp.1830–41.
- Valdecantos, M.P. et al., 2010. Vitamin C, resveratrol and lipoic acid actions on isolated rat liver mitochondria: all antioxidants but different. *Redox Report*, 15(5), pp.207–16.
- Venditti, P., Di Stefano, L. & Di Meo, S., 2013. Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species. *Mitochondrion*, 13(2), pp.71–82.
- Venselaar, H. et al., 2010. Protein structure analysis of mutations causing inheritable diseases. An e-Science approach with life scientist friendly interfaces. *BMC bioinformatics*, 11(1), p.548.
- Vernay, A. et al., 2017. MitoNEET-dependent formation of intermitochondrial junctions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, p.201706643.
- Vijayakrishnan, S. et al., 2010. Solution structure and characterisation of the human pyruvate dehydrogenase complex core assembly. *Journal of molecular biology*, 399(1), pp.71–93.
- Vinothkumar, K.R., Zhu, J. & Hirst, J., 2014. Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 515(7525), pp.80–4.
- Voet, D. & Voet, J.G., 1995. *BIOCHEMISTRY SECOND EDI.* J. WILEY, ed., New York.
- Wachnowsky, C., Fidai, I. & Cowan, J.A., 2018. Iron-sulfur cluster biosynthesis and trafficking-impact on human disease conditions. *Metallomics*, 10(1), pp.9–29.
- Wai, T. & Langer, T., 2016. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(2), pp.105–17.
- Weiner, B.E. et al., 2007. An iron-sulfur cluster in the C-terminal domain of the p58 subunit of human DNA primase. *The Journal of biological chemistry*, 282(46), pp.33444–51.

- Wiedemann, N. et al., 2006. Essential role of Isd11 in mitochondrial iron-sulfur cluster synthesis on Isu scaffold proteins. *The EMBO journal*, 25(1), pp.184–95.
- Willems, P. et al., 2013. BOLA1 is an aerobic protein that prevents mitochondrial morphology changes induced by glutathione depletion. *Antioxidants & redox signaling*, 18(2), pp.129–38.
- Witkowski, A., Joshi, A.K. & Smith, S., 2007. Coupling of the de novo fatty acid biosynthesis and lipoylation pathways in mammalian mitochondria. *The Journal of biological chemistry*, 282(19), pp.14178–85.
- Wittig, I. et al., 2006. Supercomplexes and subcomplexes of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1757(9–10), pp.1066–72.
- Yankovskaya, V. et al., 2003. Architecture of Succinate Dehydrogenase and Reactive Oxygen Species Generation. *Science*, 299(5607), pp.700–4.
- Ye, H. & Rouault, T.A., 2010. Human iron-sulfur cluster assembly, cellular iron homeostasis, and disease. *Biochemistry*, 49(24), pp.4945–56.
- Yi, X. & Maeda, N., 2005. Endogenous production of lipoic acid is essential for mouse development. *Molecular and cellular biology*, 25(18), pp.8387–92.
- Youle, R.J. & van der Bliek, A.M., 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science (New York, N.Y.)*, 337(6098), pp.1062–5.
- Yu, T. et al., 2008. Mitochondrial fission mediates high glucose-induced cell death through elevated production of reactive oxygen species. *Cardiovascular research*, 79(2), pp.341–51.
- Zay, A. et al., 2011. Glycine cleavage enzyme complex: Molecular cloning and expression of the H-protein cDNA from cultured human skin fibroblasts. *Biochemistry and Cell Biology*, 89(3), pp.299–307.
- Zemirli, N., Morel, E. & Molino, D., 2018. Mitochondrial Dynamics in Basal and Stressful Conditions. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(2), p.564.
- Zheng, L. et al., 1993. Cysteine desulfurase activity indicates a role for NIFS in metallocluster biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(7), pp.2754–8.
- Zhu, J., Vinothkumar, K.R. & Hirst, J., 2016. Structure of mammalian respiratory complex I. *Nature*, 536(7616), pp.354–8.
- Zorov, D.B., Juhaszova, M. & Sollott, S.J., 2014. Mitochondrial Reactive Oxygen Species (ROS) and ROS-Induced ROS Release. *Physiological Reviews*, 94(3), pp.909–950.

Titre : Exploration d'anomalies mitochondriales dans les fibroblastes de patients atteints de déficit dans les voies de biogenèse des centres fer-soufre ou de synthèse de l'acide lipoïque.

Mots clés : centres fer-soufre ; synthèse de l'acide lipoïque ; anomalies de lipoylation ; syndrome multiple de dysfonctionnement mitochondrial ; mitochondrie ; métabolisme énergétique

Résumé : Le but de cette thèse est d'étudier les modifications biochimiques mitochondriales liées à un défaut de lipoylation des protéines dans les fibroblastes de 14 patients. Ces patients sont porteurs d'une mutation dans un gène codant une des protéines impliquées soit dans la synthèse de l'acide lipoïque (LIPT1, LIPT2) soit dans la voie de biogenèse mitochondriale des centres Fe-S (FDX1L, ISCA1, ISCA2, IBA57, NFU1, BOLA3). La voie de biogenèse des centres Fe-S est nécessaire à la maturation des protéines Fe-S mitochondriales, dont la lipoic acid synthase (LIAS).

Ces travaux ont permis d'étudier notamment un deuxième cas de déficit en FDX1L ainsi qu'un patient porteur d'une nouvelle mutation dans *ISCA1*. Les déficits dans la voie de la biogenèse des centres Fe-S observés chez les patients étudiés affectent principalement la maturation des protéines mitochondriales à centre [4Fe-4S] dont l'aconitase mitochondriale, les complexes I et II de la chaîne respiratoire et la LIAS, induisant ainsi un défaut de lipoylation d'enzymes clés du métabolisme énergétique (PDHc, KGDHc). Aucune atteinte du réseau mitochondrial ni de variations du stress oxydatif n'ont pu être mises en évidence. Finalement, l'ajout d'acide lipoïque exogène n'améliore pas les déficits observés.

Les profils d'expression des protéines dans les fibroblastes des patients suggèrent que les protéines NFU1, BOLA3 et IBA57 ainsi que ISCA1, ISCA2 et IBA57 coopèrent entre elles de manière complexe.

Title : Investigation of mitochondrial dysfunctions in fibroblasts of patients with deficiency in iron-sulfur cluster biogenesis or lipoic acid synthesis pathways.

Keywords : Iron-sulfur cluster ; lipoic acid synthesis ; lipoylation deficiency ; multiple mitochondrial dysfunction syndrome ; mitochondria ; energy metabolism

Abstract : The aim of this work is to study mitochondrial dysfunctions related to a defect of protein lipoylation in fibroblasts of 14 patients. These patients carry a point mutation in a gene encoding for a protein involved either in lipoic acid biosynthesis (LIPT1 or LIPT2) or in the mitochondrial pathway devoted to iron-sulfur cluster biogenesis (FDX1L, ISCA1, ISCA2, IBA57, NFU1, BOLA3) essential for maturation of mitochondrial Fe-S proteins such as lipoic acid synthase (LIAS). This work describes the second case of FDX1L deficiency and a patient with a new mutation in *ISCA1* gene.

We found that mitochondrial [4Fe-4S] proteins (mitochondrial aconitase, complexes I and II of the respiratory chain and LIAS) are mainly affected in fibroblasts of patients with defect in the mitochondrial Fe-S maturation pathway. Secondary, LIAS dysfunction leads to decreased lipoylation of PDHc and KGDHc, complexes involved in energy metabolism. Neither mitochondrial network nor oxidative stress biomarkers was modified in our study. Addition of exogenous lipoic acid did not rescue the mitochondrial deficiency.

Protein expression profiles obtained in fibroblasts of patients suggest that NFU1, BOLA3 and IBA57 and also ISCA1, ISCA2 and IBA57 could function and interact together to form protein complexes.

