



HAL
open science

Impact du glutamate et des voies de signalisations associées dans la physiopathologie du syndrome MELAS révélé par une approche multi-omiques et corrigé par l'utilisation des corps cétoniques

Sophie Belal

► **To cite this version:**

Sophie Belal. Impact du glutamate et des voies de signalisations associées dans la physiopathologie du syndrome MELAS révélé par une approche multi-omiques et corrigé par l'utilisation des corps cétoniques. Médecine humaine et pathologie. Université d'Angers, 2020. Français. NNT : 2020ANGE0060 . tel-03599671

HAL Id: tel-03599671

<https://theses.hal.science/tel-03599671v1>

Submitted on 7 Mar 2022

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.

THESE DE DOCTORAT DE SOPHIE BELAL

L'UNIVERSITE D'ANGERS

ECOLE DOCTORALE N° 605

Biologie Santé

Spécialité : Biologie Cellulaire, Biologie du Développement

Par

Sophie BELAL

Impact du glutamate et des voies de signalisations associées dans la physiopathologie du syndrome MELAS révélé par une approche multi-omiques et corrigé par l'utilisation des corps cétoniques

Thèse présentée et soutenue à Angers, le 08/12/20

Unité de recherche : UMR CNRS 6015, INSERM U1083, Institut MitoVasc, Equipe MitoLab

Rapporteurs avant soutenance :

Agnès DELAHODDE Directrice de recherche
Institut de Biologie intégrative de la cellule -
Equipe Fonctions et Dysfonctions des Mitochondries
Université Paris sud

Stéphane ALLOUCHE Professeur des universités- Praticien hospitalier
Secteur biochimie général
CHU Caen

Composition du Jury :

Examineurs :	Agnès DELAHODDE	Directrice de recherche Institut de Biologie intégrative de la cellule - Equipe Fonctions et Dysfonctions des Mitochondries Université Paris sud
	Stéphane ALLOUCHE	Professeur des universités- Praticien hospitalier Secteur biochimie général CHU Caen
	Déborah TRIBOUILLARD-TANVIER	Chargé de recherche Institut de biochimie et génétique cellulaire UMR 5095 CNRS Bordeaux
	Guy LENAERS	Directeur de recherche Equipe Mitolab, UMR MitoVasc, CNRS 6015 INSERM 1083, Angers
Directeur de thèse :	Vincent PROCACCIO	Professeur des universités- Praticien hospitalier Equipe Mitolab, UMR MitoVasc, CNRS 6015 INSERM 1083, Angers
Co-directeur de thèse :	Arnaud CHEVROLLIER	Maitre de conférence Equipe Mitolab, UMR MitoVasc, CNRS 6015 INSERM 1083, Angers

Invité

Franck LETOURNEL	Docteur UF de neurobiologie-neuropathologie CHU Angers
------------------	--

L'auteur du présent document vous autorise à le partager, reproduire, distribuer et communiquer selon les conditions suivantes :



- Vous devez le citer en l'attribuant de la manière indiquée par l'auteur (mais pas d'une manière qui suggérerait qu'il approuve votre utilisation de l'œuvre).
- Vous n'avez pas le droit d'utiliser ce document à des fins commerciales.
- Vous n'avez pas le droit de le modifier, de le transformer ou de l'adapter.

Consulter la licence creative commons complète en français :

<http://creativecommons.org/licences/by-nc-nd/2.0/fr/>



REMERCIEMENTS

Tout d'abord je voudrais remercier le Dr. Delahodde et le Pr. Allouche d'avoir accepté de prendre sur leur temps pour examiner ce travail de thèse en tant que rapporteur. Je remercie sincèrement tous les membres de mon jury : Dr Tribouillard-Tanvier, Dr Letournel, Dr Lenaers.

Je tiens également à remercier le Pr Henrion d'avoir accepté que je commence une thèse au sein de l'unité Mitovasc.

Mes remerciements vont ensuite bien sûr à mon directeur de thèse, Vincent Procaccio et mon Co-directeur, Arnaud Chevrollier. Merci de m'avoir donné l'opportunité d'entreprendre cette thèse. Merci pour votre soutien et de m'avoir laissé cette autonomie durant ces années. Cette expérience a vraiment été très enrichissante pour moi. Plus personnellement merci à Vincent d'avoir pris énormément sur son temps pour discuter de mon projet. Pour ses conseils sur les points sensibles et de m'avoir redonné confiance en moi et en mon projet quand j'étais un peu dans le noir. Merci Arnaud, ton regard plus extérieur au projet m'a souvent donné de bonnes idées et tu as été source de bons conseils, merci également pour ta gentillesse.

Un grand merci au Dr Lenaers, ton arrivée au laboratoire a entraîné un fort dynamisme dans l'équipe. Je te remercie également pour ton extrême gentillesse, et ton côté très motivant et très humain. Merci également pour ton implication et tes conseils dans les différents projets du laboratoire.

Je tiens également à remercier Dr Letournel pour m'avoir suivi durant toutes ces années, par votre accessibilité et vos conseils. Merci également aux membres de votre équipe Catherine et Isabelle, de m'avoir accueilli merveilleusement bien et tout appris sur les manipulations d'immunohistochimie.

Je tiens également à remercier les anciens membres de l'équipe. Merci à Aurore, tu es vraiment une belle rencontre, ta gentillesse et ton empathie sont vraiment ce qui te définit et je suis vraiment heureuse d'avoir partagé ces quelques années avec une collègue comme toi. Merci à Selma pour ta bonne humeur et ta gentillesse, pour tous tes conseils et discussions sur les manips, mais également pour tous nos super moments passés au labo et à l'extérieur. Merci à Jenny pour tes fous rires contagieux et ta folie, mais également pour ton autre côté, ton écoute et compréhension et bien sûr pour tous les moments passés hors labo. Merci à Guillaume, mon collègue de galère. J'ai réellement aimé toutes nos longues discussions scientifiques et énormes schémas à la clé, nos énormes manips. Mais bien sûr, aussi ton côté moins sérieux et supers moments en salle de pause et hors labo. Merci également à Jamal la princesse chanteuse, Philippe le roi de la microscopie, Judith la métabo girl, et Majida la discrète, même si je vous ai moins connus, chacun d'entre vous a apporté au sein de l'équipe et a contribué à cette bonne ambiance. Et bien sûr merci à tous les stagiaires qui sont passés au sein de Mitolab pendant ces années. Un merci spécifique à Rayane pour m'avoir aidé dans ce projet et qui a effectué autant de lames en si peu de temps, tu es un stagiaire du tonnerre et tu feras pour sûr un super médecin.

Merci aux membres présents. Tout d'abord je tiens à remercier Naig, Valérie, Céline et Steph. Vous êtes les personnes qui m'ont accueilli au sein du laboratoire. Et hormis votre super accueil vous m'avez tous apporté scientifiquement et aidé dans mes débuts. Un grand merci à Aurélie, pour ta joie de vivre et ta gentillesse et bien sûr pour ta grande aide pour mes oxygraphies. Un énorme merci à Cinzia, bien sûr pour tes nombreuses heures passées sur la métabo, mais également pour ta gentillesse et ta façon de te plier en quatre pour que tout le monde soit bien, tu as un savoir vivre extraordinaire. Je te souhaite également plein de bonheur pour cette nouvelle aventure qui va pour sûr être extraordinaire. Un grand merci à Morgane, tu es une personne qui mérite d'être connue, ton franc-parler peut déstabiliser, mais tu es une personne honnête et juste, sans oublier tes fous rires qui resteront gravés à vie dans ma mémoire. Je te souhaite également plein de bonheur pour ta nouvelle aventure. Merci à Salim, pour tous tes conseils et motivations dans mes débuts, mais également pour les nombreux délires partagés. Jade, ma petite Jade tu es la prochaine sur la liste et tu mérites à cette effet une mention spéciale. Tu es quelqu'un de très doux et d'une extrême sensibilité, je suis ravie d'avoir fait ta connaissance et je te souhaite bien sûr le meilleure pour la suite. Merci à Caroline pour ton extrême gentillesse. D'avoir supporté mon anglais de soirée et dire qu'il n'était pas si mauvais, de prendre autant de nouvelles des filles...tu es vraiment quelqu'un de très doux et attentionné. Merci Olivier pour ton expertise scientifique, tu es toujours de bon conseil, mais également pour ces moments de guitare, chant très sympa. Un grand merci à Cédric, Lydie et Juan pour votre aide apporté à mon projet. Je remercie maintenant tous les autres membres du labo que je connais moins sachant que cette dernière année fût rythmée par le coronavirus et mon côté moine à écriture dans mon bureau. Un grand merci à Nancy, Anaïs, Magalie, Charlène, Charlotte, Florian et Jeremy.

Je souhaite également remercier ceux sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Mes professeurs, maitre de stage ...qui m'ont donné cette envie d'apprendre et de comprendre. Une mention spéciale pour mon maitre de stage de master Fabien. Tu es quelqu'un de passionné et qui transmet sa passion. J'ai eu une chance inouïe de commencer dans le monde de la recherche avec un encadrant comme toi.

Je tiens également à remercier mes Amis. Un énorme merci à ma chacha, nous avons commencé ce parcours ensemble il y maintenant presque 15 ans. Déjà à l'époque celui-ci été cerné de doutes et de désillusions. Mais avec toi le moins drôle a toujours un côté ultra comique et je ne peux oublier nos 100 000 fous rires de fac (mes abdos en témoignaient durant cette époque). Merci à toi d'être ce que tu es et d'être toujours présente pour moi. La suite coule de source, merci à Yaya, je ne savais pas où te mettre Collègue ? Ami ? Donc même si tu es mon collègue, je te considère bien plus comme un ami. Tu es quelqu'un de confiance et sur qui on peut vraiment compter et je suis très heureuse que Chacha soit avec toi et d'avoir par ce fait pu faire ta connaissance. Un grand merci à mon Judi qui après toute ces années et encore présent et ne change pas.

Et bien sûr ma famille. Ma maman que j'admire et qui a su avec une douceur extraordinaire sortir le meilleur de moi. Tu es mon idole et j'espère que je serai à ta hauteur. A mon grand petit frère sans qui je ne serai pas là aujourd'hui. Qui fait que je me bats chaque jour pour croire en mes rêves et qui me fais me relever quand le monde de la recherche devient impitoyable. A ma mamie qui me soutient depuis le début et qui est toujours là pour moi. A Gérard pour me redonner confiance, pour ta gentillesse et pour le fait de pouvoir compter sur toi. Je remercie également tous les autres membres de ma famille.

Et enfin je remercie les trois amours de ma vie. Un énorme merci à l'homme qui partage ma vie. Plus de 10 ans que nous partageons cette barque, ensemble à affronter d'énormes vagues. Tu as été et tu es toujours là pour moi, le reste est trop personnel, mais pour tout, je t'aime de tout mon cœur. Et enfin à mes deux merveilles, mes deux amours, Aëlia et Maëline...Vos sourires et joie de vivre me donnent envie de me battre encore plus fort pour mes rêves et convictions dont la recherche fait partie.

Sommaire

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION

1. La mitochondrie : généralités

- 1.1. Historique
- 1.2. Origine endosymbiotique
- 1.3. Structure
 - 1.3.1. La membrane externe
 - 1.3.2. La membrane interne
 - 1.3.3. L'espace intermembranaire
 - 1.3.4. La matrice
 - 1.3.5. Organisation
 - a) Mécanismes moléculaires de la dynamique mitochondriale
 - b) Modification des acteurs moléculaires de la dynamique mitochondriale et pathologies

2. La mitochondrie centre de production d'énergie

- 2.1. La glycolyse
- 2.2. La voie des pentoses phosphates
- 2.3. Le métabolisme des acides aminés
 - 2.3.1. La transamination
 - a) L'aspartate aminotransférase (AST)
 - b) Alanine aminotransférase (ALT)
 - 2.3.2. La désamination oxydative
 - a) Composition et localisation
 - b) Régulation
 - c) Fonction
 - d) GDH et Pathologies
- 2.4. Le cycle de krebs
- 2.5. Les corps cétoniques

3. La chaîne oxydative mitochondriale

- 3.1. Fonctionnement
- 3.2. Composition
 - 3.2.1. Le complexe I : NADH Ubiquinone Oxydo-réductase
 - a) Composition du complexe I
 - b) Assemblage du complexe I
 - 3.2.2. Le complexe II : Succinate Ubiquinone Oxydo réductase
 - 3.2.3. Le complexe III : L'ubiquinol cytochrome c réductase
 - 3.2.4. Le complexe IV : Cytochrome C oxydase
 - 3.2.5. L'ATP synthase

4. Le génome mitochondrial

- 4.1. Composition du génome mitochondrial humain
- 4.2. Réplication de l'ADN mitochondrial
 - 4.2.1. Modèle de réplication asynchrone
 - 4.2.2. Modèle de réplication synchrone
- 4.3. Transmission maternelle
- 4.4. Concept de l'hétéroplasmie et ségrégation mitotique

5. Les pathologies mitochondriales

- 5.1. Pathologies du génome mitochondrial
 - 5.1.1. Les mutations ponctuelles de l'ADNmt
 - a) Défaut de synthèse des protéines de la chaîne respiratoire
 - b) Mutations des ARNt et ARNr
 - 5.1.2. Les délétions uniques de l'ADNmt
- 5.2. Pathologie de l'ADN nucléaire
 - 5.2.1. Gènes impliqués dans la structure et l'assemblage des différents complexes de la chaîne mitochondriale
 - 5.2.2. Gènes impliqués dans la synthèse des protéines mitochondriales
 - 5.2.3. Gènes impliqués dans le maintien du génome mitochondrial
- 5.3. Diagnostic des maladies mitochondriales
 - 5.3.1. Antécédents familiaux et symptômes
 - 5.3.2. Examens paracliniques
 - 5.3.3. Examens métaboliques
 - 5.3.4. Analyse tissulaire
 - 5.3.5. Analyse génétique
 - 5.3.6. L'essor de l'utilisation des technologies OMICs dans le diagnostic des pathologies mitochondriales
 - a) La génomique
 - b) La transcriptomique
 - c) La protéomique
 - d) La métabolomique

6. Le syndrome MELAS

- 6.1. Critères diagnostics du syndrome MELAS
- 6.2. Aspects cliniques du syndrome MELAS
 - 6.2.1. Manifestations neurologiques principales
 - 6.2.2. Manifestations musculaires
 - 6.2.3. Acidose lactique
 - 6.2.4. Autres manifestations cliniques
- 6.3. Physiopathologie du syndrome MELAS
 - 6.3.1. Dysfonction du métabolisme oxydatif

- a) Transcription de l'ARNt Leu (UUR) et MELAS
- b) Structure et stabilisation de l'ARNt Leu (UUR)
- c) Synthèse protéique
- 6.3.2. Angiopathie relative à une carence en NO
- 6.4. Thérapies
- 6.4.1. Aspects thérapeutiques
 - a) Traitements symptomatiques
 - b) Traitements visant à restaurer la fonction énergétique mitochondriale
- 6.5. Modèles d'études

7. Altération du métabolisme des acides aminés dans les pathologies

- 7.1.1. Rôles du glutamate
 - a) Glutamate un acide aminé neurotransmetteur excitateur
 - b) Autres rôles du glutamate
- 7.1.2. Le glutamate est au carrefour des voies métaboliques
- 7.1.3. Rôles du Glutamate dans les pathologies
 - a) Les phénomènes d'excitotoxicité
 - b) Glutamate et épilepsie
- 7.1.4. Corps cétoniques et métabolisme du glutamate/GABA
 - a) Le régime cétogène
 - b) Formation des corps cétoniques : la cétogenèse et métabolisme neuronal
 - c) Exemple de l'application du régime cétogène dans certaines pathologies
 - d) Implication des corps cétoniques sur le métabolisme du glutamate et GABA

PROBLEMATIQUE

RESULTATS

1. Amélioration du métabolisme oxydatif, ainsi que l'assemblage et activité du complexe I dans les cybrides MELAS suite à un traitement avec les corps cétoniques

- 1.1. Introduction
- 1.2. Article
- 1.3. Résultats/Discussion et Perspectives
 - a) Confirmation d'un métabolisme oxydatif altéré dans les cybrides MELAS
 - b) Amélioration de la respiration mitochondriale et du métabolisme oxydatif des cybrides MELAS après traitement avec les corps cétoniques
 - c) Amélioration de l'assemblage du complexe I de la chaîne mitochondriale et augmentation de la quantité d'ADNmt après traitement par les corps cétoniques dans les cybrides MELAS

2. Réduction des intermédiaires d'assemblage du complexe I via la restriction calorique dans les cybrides MELAS

- 2.1. Introduction
- 2.2. Article
- 2.3. Résultats/ Discussion et Perspectives
 - 2.3.1. Analyse du défaut d'assemblage du complexe I dans les cybrides MELAS

2.3.2. Réduction des intermédiaires d'assemblage, associé à une amélioration du métabolisme oxydatif dans les cybrides MELAS sous restriction glucidique

3. Le glutamate un acide aminé clé dans le MELAS

3.1. Introduction

3.2. Article

3.3. Résultats/ Discussion et Perspectives

3.3.1. Mise en évidence d'une signature métabolique pour les cybrides MELAS

3.3.2. La concentration de glutamate est augmentée en lien avec le déficit du complexe I dans les cybrides MELAS

3.3.3. Les corps cétoniques restaurent à la fois une concentration intracellulaire normale du glutamate mais également améliorent les fonctions mitochondriales et le réseau mitochondrial des cybrides MELAS

3.3.4. Altération des voies du métabolisme impliquant le glutamate dans le syndrome MELAS

a) Exemple des cybrides MELAS

b) Confirmation du rôle du glutamate à partir de tissus autopsiques de cerveau d'un patient MELAS

3.3.5. Mise en évidence d'une dysfonction du cycle de Krebs améliorée après exposition aux corps cétoniques dans les cybrides MELAS.

DISCUSSION GENERALE

1. Apport de nos études sur la physiopathologie du MELAS

1.1.1. Défaut d'assemblage et d'activité du complexe I entraînant un défaut oxydatif de la cellule et impact sur les processus de biogénèse et mitophagie via l'utilisation de stratégies métaboliques

1.1.2. Intérêt des outils multi-omiques dans la découverte de nouveaux acteurs dans la physiopathologie du MELAS

2. Apports diagnostiques et thérapeutiques pour le syndrome MELAS

2.1. Le glutamate marqueur potentiel du syndrome MELAS ?

2.1.1. Analyse du glutamate à partir de plasmas de patients MELAS

2.1.2. Conclusion et perspectives

2.2. Identification de cibles visant le glutamate et/ou les voies métaboliques impliquant le glutamate

CONCLUSION

BIBLIOGRAPHIE

TABLE DES ILLUSTRATIONS

TABLE DES TABLEAUX

Liste des abréviations

AAE Acides Aminés Excitateurs
ABAT GABA Transaminase
AcAc Acétoacétate
ACAD Acyl-CoA deshydrogénase
AcCoA Acétyl CoEnzyme A
ADN Acide Désoxyribo-Nucléique
ADNmt Acide Désoxyribo-Nucléique mitochondrial
ADNn Acide Désoxyribo-Nucléique nucléaire
ADOA Atrophie Optique Dominante
ADP Adénosine-5-Diphosphate
AG Acide-Gras
ALT Alanine aminotransférase
ARN Acide Ribo-Nucléique
AST Aspartate aminotransférase
ATG Autophagy related protein
ATP Adénosine-5-TriPhosphate
AVC Accident-Vasculaire-Cérébral
BHE Barrière Hémato-Encéphalique
C (I à V) Complexes (I à V)
Ca²⁺ Ions Calcium
CK Cycle de krebs
CO₂ Dioxyde de Carbone
CoA CoEnzyme A
COX Cytochrome C oxidoreductase
CS Citrate synthase
DRP1 Dynamin-Related Protein 1
EAAT Transporteurs d'acides aminés excitateurs
FAD Flavine Adénine Dinucléotide
FADH₂ Forme réduite de la Flavine Adénine Dinucléotide
FIS1 Fission protein 1

FMN Flavine Mononucléotide

G3P Glycérol-3-phosphate

GABA Gamma-aminobutyrique acide

GAD Glutamate décarboxylase

GDH Glutamate déshydrogénase

GTP Guanosine TriPhosphate

H2O Eau

H2O2 Peroxyde d'Hydrogène

kDa Kilo Dalton

KO Knock-Out

KSS Kearns-Sayre syndrome

LDH Lactate DesHydrogénase

LHON Leber Hereditary Optic Neuropathy

ME Membrane Externe

MELAS Mitochondrial Encephalopathy and Lactic Acidosis Syndrome

MERRF Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibbers

MET Microscopie Electronique à Transmission

MFN MitoFusin protein

Mg2+ Ions magnesium

MI Membrane Interne

mt Mitochondrial

mTOR mammalian Target Of Rapamycin

mtTFA mitochondrial Transcription Factor A

Na+ Ion Sodium

NAD+ Nicotinamide adénine dinucléotide

NADH forme réduite du Nicotinamide adénine dinucléotide

ND NADH dehydrogenase

NGS Next Generation Sequencing

NO Monoxyde d'azote

O2 Dioxygène

OPA-1 Dynamin-like 120 kDa protein

PARP poly (ADP ribose) Polymerase

PDH Pyruvate Deshydrogénase

PDK Pyruvate Deshydrogénase Kinase

PDP Pyruvate Deshydrogénase Phosphatase

PGC-1 α Peroxisome proliferator-activated receptor coactivator-1 alpha

pH Potentiel hydrogène

Pi Phosphate inorganique

PLP Pyridoxal phosphate

PMP Pyridoxal 5'phosphate

ROS Reactive Oxygen Species

RSV Resveratrol

SDH Succinate Deshydrogenase

SDHA Succinate Deshydrogénase A

SDHB Succinate Deshydrogénase B

SDHC Succinate Deshydrogénase C

SDHD Succinate Deshydrogénase D

SOD SuperOxide Dismutase

SOD1 Cuivre Zinc SuperOxyde Dismutase

SOD2 Manganèse Superoxyde Dismutase

SSA Semialdéhyde succinique

SSAD SSA Déshydrogénase

TIM Translocase Inner Membrane

TOM Translocase Outer Membrane

VDAC Voltage Dependant Anion Channel

VUS Variant de signification inconnue

WES Whole Exome Sequencing

WGS Whole Genome Sequencing

β OHB β -HydroxyButyrate.

Introduction

1. La mitochondrie : généralités

1.1. Historique

Observée pour la première fois en 1857 par Rudolph Kölliker au niveau de sarcoplasmes de muscles d'insectes, la mitochondrie est alors décrite comme un organe possédant un cytoplasme granuleux (« chondros » en grec) et possédant sa propre membrane. Les avancées des techniques de coloration permettent en 1890 par Altmann de mettre en évidence des structures filamenteuses (« mitos » en grec). En 1912, Kingsbury les relie à la respiration cellulaire, puis en 1913, Warburg met en évidence la présence d'enzymes de respiration. En 1950, Palade observe au microscope électronique et décrit la structure interne de la mitochondrie. Ce modèle décrit la mitochondrie comme un organe isolé à deux membranes : une externe (ME) et une interne (MI), la dernière présentant des invaginations appelées « crêtes » (Palade, 1953). En parallèle à ces découvertes structurales l'isolement mitochondrial a permis de mettre en évidence plusieurs fonctions métaboliques de la mitochondrie, comme la β -oxydation des acides gras (Kennedy and Lehninger, 1949).

L'autre découverte majeure est l'identification de son propre ADN mitochondrial (ADNmt). En effet, en 1963 Magrit et Sylvan visualisent par microscopie électronique sur des embryons de poussins des fibres dans les mitochondries ressemblant sensiblement à des acides nucléiques (Nass and Nass, 1963). Cette découverte a déclenché de nombreuses spéculations sur l'origine endosymbiotique de la mitochondrie. A la suite de la découverte de l'ADNmt, en 1988 Wallace et Holt sont les premiers à identifier des mutations touchant les sous unités codées par l'ADNmt en lien avec des maladies mitochondriales (Holt et al., 1988; Wallace et al., 1988). Les recherches pour comprendre les mécanismes de transmission mitochondriale ont permis également de mettre en évidence le rôle essentiel de la fission, fusion dans ces processus. La dynamique mitochondriale a également été montrée comme un élément clé dans les processus d'apoptose et dans l'apparition de certaines maladies neurodégénératives (Liesa et al., 2009).

1.2. Origine endosymbiotique

Selon la théorie endosymbiotique, les mitochondries dériveraient de l'endocytose de bactéries par des archées. La théorie de l'endosymbiose a largement été supportée par Lynn Margulis, les arguments en faveur de cet événement sont la présence d'un génome circulaire de petite taille, comme celui retrouvé chez la bactérie, l'existence d'une double membrane dont l'une pourrait provenir de la cellule hôte et la capacité de la mitochondrie à se diviser de manière autonome (Symbiosis in cell evolution, Margulis).

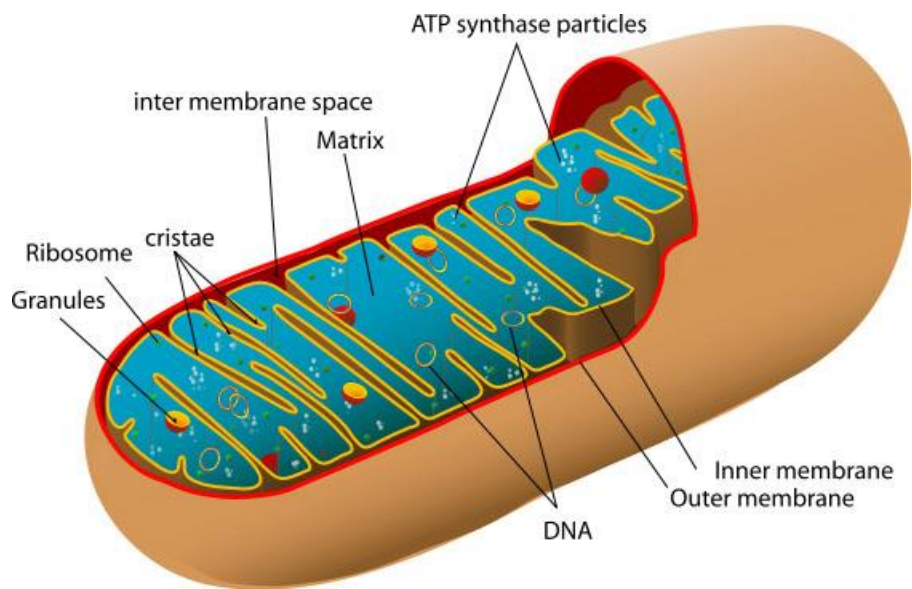


FIGURE 1 : La structure de la mitochondrie

Les membranes internes et externes de la mitochondrie délimitent deux compartiments : l'espace inter-membranaire et la matrice, au sein de laquelle se trouve l'ADN mitochondrial. La membrane interne forme des replis appelés crêtes. (D'après <https://www.umdfr.org>)

1.3. Structure

La mitochondrie est constituée d'une enveloppe formée de deux membranes, la membrane externe et la membrane interne, qui délimitent deux compartiments, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale.

1.3.1. La membrane externe

La membrane externe est composée d'une bicouche lipidique présentant 50% de lipides, essentiellement des phospholipides et de 50% de protéines. Elle est semi-perméable grâce à la présence de nombreux pores transmembranaires, les porines ou VDAC (Voltage-Dependant Anion Channel) formant un canal hydrophile de 2-3 nm et permettant le passage de petites molécules de poids moléculaire compris entre 5 et 10 kDa. Pour les plus grosses protéines on retrouve des complexes TOM (Translocase of Outer Membrane).

1.3.2. La membrane interne

La membrane interne se compose majoritairement de protéines (80%) avec peu de lipides (20%). Elle contient notamment un phospholipide essentiel, la cardiolipine (15 à 20% des lipides) qui joue un rôle dans le maintien des fonctions des protéines associées à la membrane mitochondriale (Daum, 1985). Elle a une perméabilité très sélective et est particulièrement imperméable aux petites molécules chargées. De ce fait, le passage des molécules à travers la membrane interne nécessite la présence de transporteurs ou de navettes (navettes glycérol-3-phosphate, malate/aspartate). Elle possède également des complexes TIM (Translocase of Inner Membrane) pour prendre le relais des complexes TOM et permette ainsi l'entrée de grosses protéines vers la matrice. La membrane interne possède une très grande surface de contact entre l'espace intermembranaire et la matrice par la formation de replis appelés crêtes mitochondriales.

1.3.3. L'espace intermembranaire

Entre ces deux barrières lipidiques on retrouve l'espace intermembranaire. Cet espace est également fortement concentré en protons et on y retrouve de nombreuses enzymes comme le cytochrome C ou des enzymes qui métabolisent l'ATP telles que la créatine kinase, la myokinase et la nucléoside diphosphate kinase.

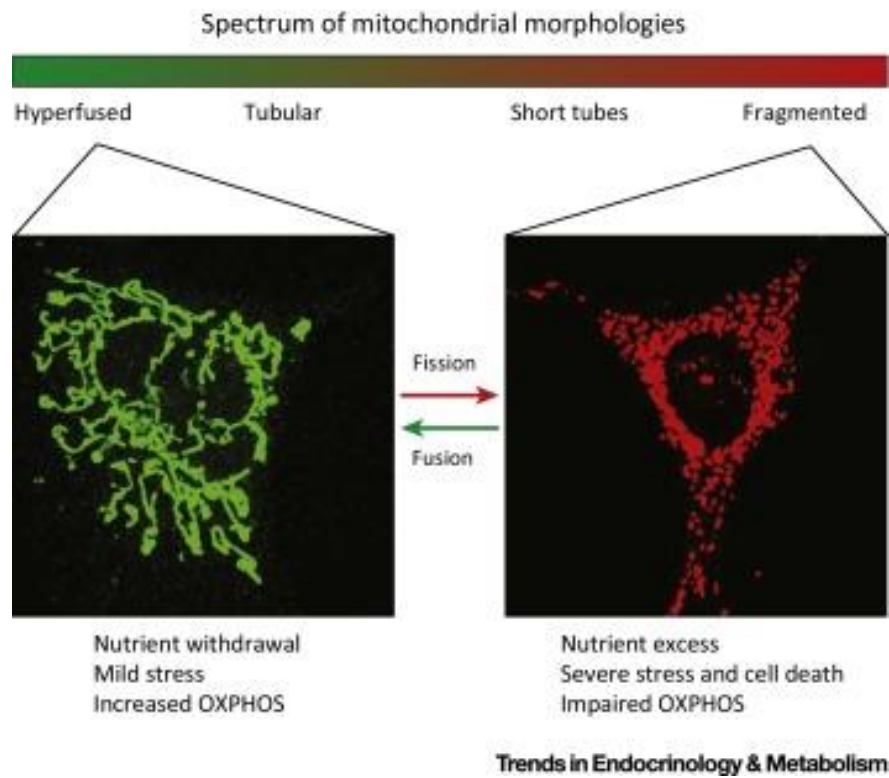


FIGURE 2 : La dynamique mitochondriale.

Variation de la dynamique mitochondriale en fonction de l'état des stimuli métaboliques dans des fibroblastes de souris. A gauche les mitochondries marquées avec un fluorophore vert correspondant à un réseau connecté et à droite des mitochondries marquées avec un fluorophore rouge correspondant à un réseau fissionné.

D'après (Wai and Langer, 2016)

1.3.4. La matrice

La matrice mitochondriale contient entre autres l'ADNmt, des ARN messagers et des ARN de transfert ainsi que de nombreux systèmes enzymatiques, tels que les enzymes du cycle de Krebs (CK), les enzymes nécessaires à la bêta-oxydation des acides gras.

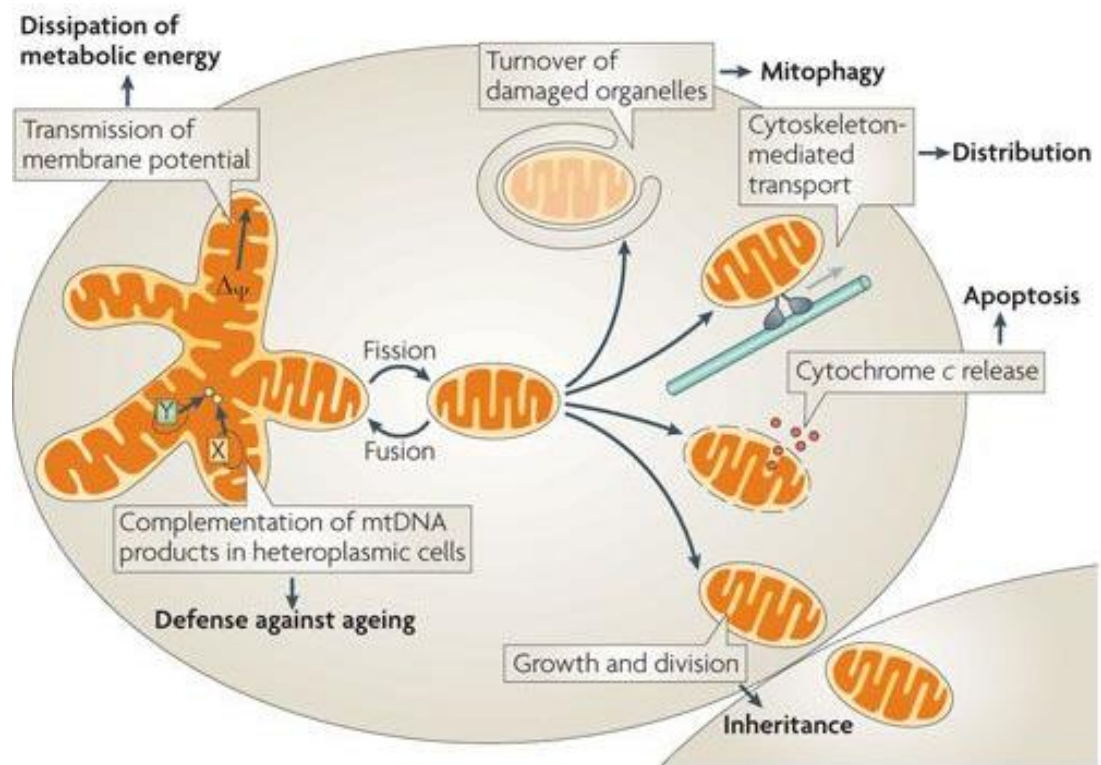
1.3.5. Organisation

Les mitochondries ne sont pas des organites isolés, en effet leurs membranes interagissent et s'organisent en un réseau hautement dynamique au sein du cytoplasme de chaque cellule. Ce réseau est en constante équilibre entre une forme granuleuse et une forme filamenteuse. La forme granuleuse correspond à la fission mitochondriale, alors que la forme filamenteuse correspond à la fusion mitochondriale. Les mitochondries subissent des processus de fission/fusion permanents lors des divisions cellulaires ou pour répondre aux besoins énergétiques et ainsi assurer l'homéostasie cellulaire (Mittra et al., 2009). Cette fragmentation mitochondriale peut être également corrélée à une augmentation de l'apport en nutriments, à des troubles cardiovasculaires ou neuromusculaires, à des processus tumoraux ou à des problèmes d'obésité (Wai and Langer, 2016). Cette dynamique mitochondriale est également la résultante d'autres processus, comme la mitophagie et la biogénèse, ainsi que le déplacement des mitochondries à l'échelle cellulaire.

a) Mécanismes moléculaires de la dynamique mitochondriale

La fusion mitochondriale permet notamment l'échange de l'ADNmt et d'autres composants entre les mitochondries. Cela leur permet de maintenir leur intégrité. La fission quant à elle permet non seulement une répartition mitochondriale suivant les besoins locaux en ATP, mais également l'élimination des mitochondries non fonctionnelles par la mitophagie (Otera and Mihara, 2011).

Les mécanismes de fusion mitochondriale sont assurés par des protéines appartenant à la famille des dynamines possédant un domaine GTPase. La fusion de la membrane externe est permise par la mitofusine 1 et la mitofusine 2 (Mfn1 et Mfn2). Ces deux protéines contiennent des domaines fonctionnels très conservés, on retrouve en N-terminal un domaine de liaison à la GTP et en C-terminal un domaine qui permet l'ancrage de la protéine à la membrane externe mitochondriale. La synthèse des mitofusines est régulée par des mécanismes transcriptionnels et post-transcriptionnels. Leurs dégradations font intervenir des processus d'ubiquitination et de phosphorylation en amont de leur adressage au protéasome (Cohen et al., 2008). Concernant la fusion des membranes internes, elle nécessite en plus des mitofusines, la présence de la protéine OPA1 (Optic Atrophy 1).



Nature Reviews | Molecular Cell Biology

FIGURE 3 : Les différentes étapes de la dynamique mitochondriale.

La fusion et la fission des mitochondries sont nécessaires à de nombreuses fonctions biologiques. La division mitochondriale est essentielle pour l'héritage et le partage des organelles pendant la division cellulaire. La mitophagie est importante pour le recyclage des mitochondries dégradées ou non fonctionnelles. D'après (Westermann, 2010)

Les mécanismes de fission mitochondriale font intervenir une protéine cytosolique, DRP1 (Dynamamin-related protein 1). Suite à des signaux spécifiques, DRP1 est transloqué du cytosol vers la membrane externe où il va être oligomérisé en structure formant un anneau sur les futurs sites de scission mitochondriale. En étroite coopération on retrouve en plus de DRP1 des récepteurs ou facteur de recrutement de DRP1 sur la membrane externe, tel que FIS1 (Mitochondrial Fission), MFF (Mitochondrial fission Factor). Des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation, ubiquitination et sumoylation affectent le recrutement de DRP1 (van der Blik et al., 2013).

La biogénèse mitochondriale permet la néo-synthèse de nouvelles mitochondries pour augmenter la masse mitochondriale ou remplacer des mitochondries défectueuses. Le principal acteur de la biogénèse mitochondriale est PGC-1 α (Peroxisome proliferator activated receptor-Gamma Coactivator-1 α).

Le processus inverse consiste à la destruction de l'organite par mitophagie. Il met en action deux protéines principales Pink-1 (PTEN induced putative kinase-1) et Parkin. Cette dernière est responsable de l'ubiquitination de protéines de la membrane externe de la mitochondrie. Celles-ci seront alors soit dégradées par le protéasome soit reconnues par des protéines appartenant à la machinerie d'autophagie comme l'Optineurin (OPTN). Cette interaction permet la formation d'un phagophore par l'intermédiaire de LC3-II et l'adressage des mitochondries vers l'autophagosome puis fusion avec des lysosomes afin qu'elles soient dégradées.

Les mitochondries sont mobiles afin d'assurer l'homéostasie cellulaire. Les protéines qui permettent ces déplacements sont Miro et Milton. Cette dernière est associée à une kinésine 1 et une dynéine permettant respectivement les mouvements antérogrades et rétrogrades le long du cytosquelette.

b) **Modification des acteurs moléculaires de la dynamique mitochondriale et pathologies**

Des mutations dans certains gènes impliqués dans la dynamique mitochondriale vont être à l'origine de différentes pathologies. Les principales neuropathies liées à la dynamique mitochondriale impliquent des mutations des gènes codant pour les protéines GDAP1, MFN2 et OPA1. Les mutations des gènes GDAP1 et MFN2 sont impliquées dans certaines formes de la maladie de Charcot Marie-Tooth (Baxter et al., 2002; Cuesta et al., 2002; Züchner et al., 2004) alors que les mutations du gène OPA1 sont responsables d'atrophie optique autosomique dominante (Alexander et al., 2000). Par exemple, un nouveau-né portant une mutation DRP1 à l'état hétérozygote à effet dominant négatif, présentait une microcéphalie, une anomalie du développement cérébral, une atrophie optique avec hypoplasie, une acidose lactique persistante et une concentration plasmatique modérément élevée en acides gras à très longue chaîne (Waterham et al., 2007).

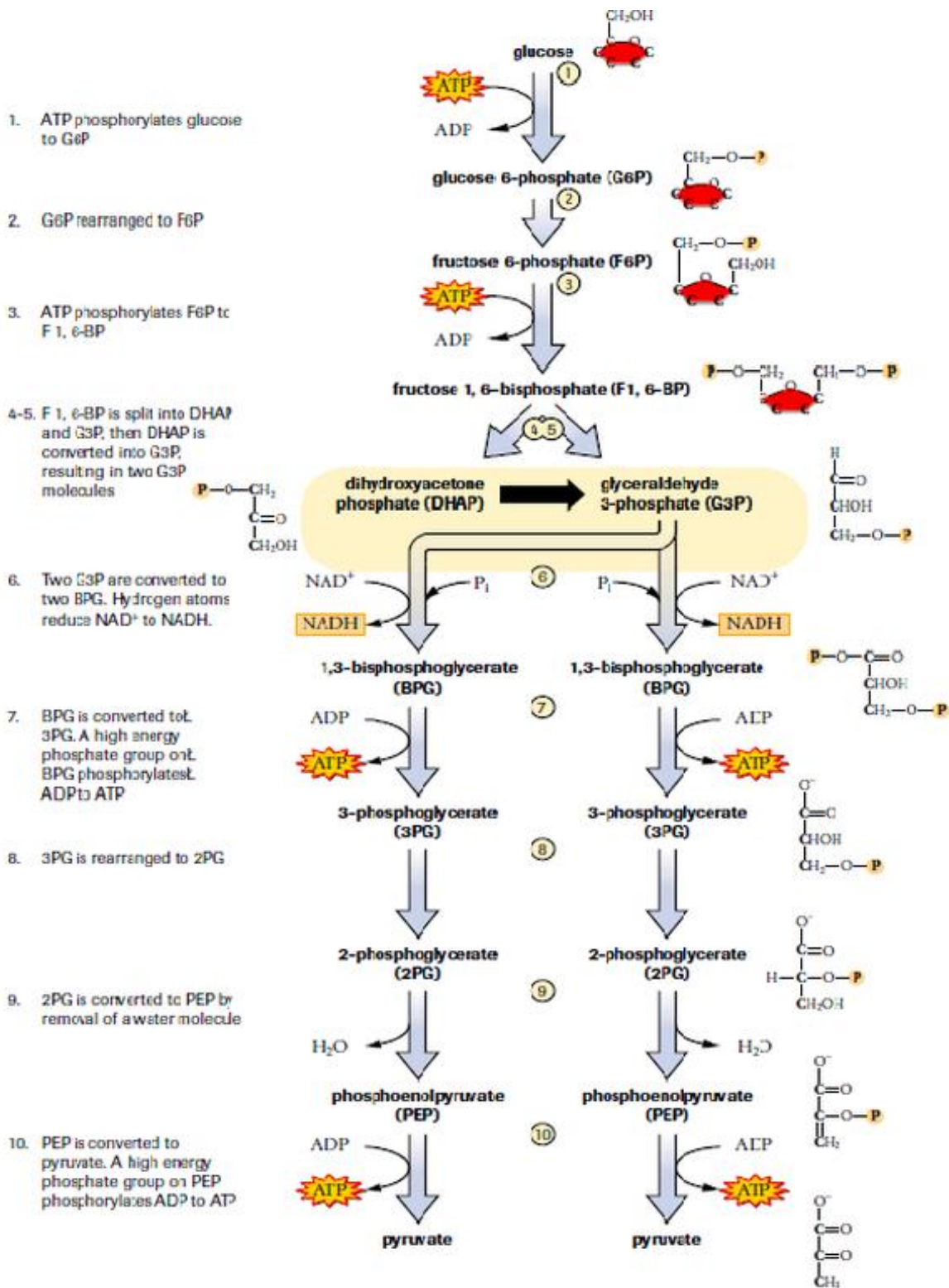


FIGURE 4 : La glycolyse.

Réactions du catabolisme du glucose en dix étapes permettant la formation de 2 molécules de pyruvates, d'ATP et de NADH. (D'après Nelson éducation 2002)

2. La mitochondrie centre de production d'énergie

Parmi les nombreuses fonctions assurées par la mitochondrie au sein de la cellule comme l'homéostasie du calcium ou son rôle dans l'apoptose, une des fonctions primordiales est son rôle dans la production d'énergie.

Le métabolisme est l'ensemble des réactions cellulaires qui permettent à un organisme de se maintenir en vie, de se développer et de se reproduire. Les voies métaboliques sont constituées d'un ensemble de réactions enzymatiques utilisant différents types de substrats (glucose, acides gras, acides aminés) afin de produire de l'énergie. Parmi ces réactions on retrouve l'anabolisme qui permet la biosynthèse de différents constituants cellulaires et le catabolisme qui permet par la dégradation de molécules une production d'énergie.

2.1. La glycolyse

La glycolyse, ou voie d'Embden-Meyerhof-Parnas est la voie métabolique cytosolique assurant le catabolisme du glucose. Elle est constituée de 10 réactions enzymatiques consécutives qui permettent la conversion d'une molécule de glucose en deux molécules de pyruvate.

On peut diviser la glycolyse en deux phases : la formation de l'énergie et sa libération.

La première phase est constituée de quatre réactions de phosphorylations des hexoses pour la formation de deux trioses (Glyceraldehyde3-P), cet ensemble de réactions consomment deux molécules d'ATP. La deuxième phase est constituée d'une série de réactions d'oxydoréductions de ces trioses conduisant à la production de deux molécules de pyruvates, 4 ATP et 2 coenzymes NADH réduits.

Selon l'état d'oxygénation de la cellule, le pyruvate a deux orientations possibles : la formation de lactate lorsque les cellules sont en anaérobie, ou l'oxydation du pyruvate lorsque les cellules sont en aérobie.

D'un point de vue rendement énergétique, la glycolyse produit seulement deux molécules d'ATP par cycle. Néanmoins, les intermédiaires produits lors de ces réactions biochimiques tels que le glycéraldéhyde 3-phosphate (G-6P) ou le 3-phosphoglycérate (3-PG) sont des précurseurs essentiels intervenant dans d'autres voies métaboliques (voie des pentoses phosphates, biosynthèse des acides gras et métabolisme des acides aminés).

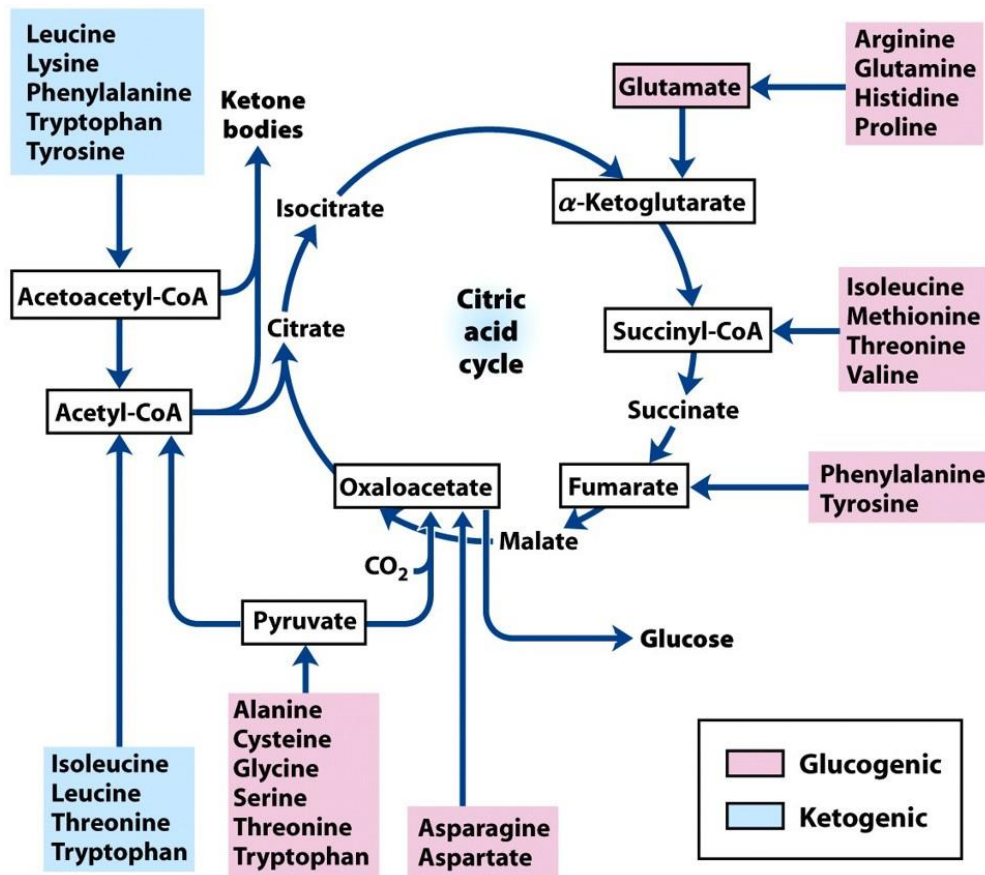


FIGURE 5 : Le métabolisme des acides aminés.

En rose sont représentés les acides aminés glucoformateurs, en bleu les acides aminés cétoènes.

D'après Lehninger's Principles of Biochemistry, 5th edition

2.2. La voie des pentoses phosphates

La voie des pentoses phosphates a également lieu dans le cytoplasme des cellules. Elle permet de générer du NADPH. Celui-ci est indispensable aux réactions réductrices de biosynthèse (en particulier, lors de la synthèse des acides gras) c'est également un cofacteur essentiel dans le contrôle des espèces réactives à l'oxygène (ROS). Outre le NADPH, la voie des pentoses phosphates fournit du ribose 5-phosphate précurseur de la synthèse des nucléotides, des acides nucléiques et des coenzymes.

2.3. Le métabolisme des acides aminés

Les acides aminés en excès ne peuvent pas être stockés, le surplus d'acides aminés peut être utilisé comme carburant métabolique. Ils subissent une première dégradation, la transamination qui permet de séparer le groupement alpha aminé du squelette de carbone. La seconde étape est la désamination du groupement alpha aminé en ion ammonium qui sera récupéré puis éliminé car toxique (cycle de l'urée). Le squelette carboné obtenu après le départ du groupement aminé peut aussi être récupéré pour synthétiser l'acide aminé correspondant ou servir de précurseur à la synthèse des glucides ou convertis en Acétyl-CoA pour la synthèse des acides gras. Les acides aminés dont le catabolisme du squelette carboné forme du pyruvate ou des intermédiaires du CK sont appelés acides aminés glucoformateurs, ceux dont le catabolisme du squelette carboné forme de l'Acétyl-Coa ou Acétoacétyl-CoA sont appelés acides aminés cétoènes. Ils existent également des acides aminés dits mixtes c'est-à-dire qu'ils peuvent être à la fois glucoformateurs et cétoènes.

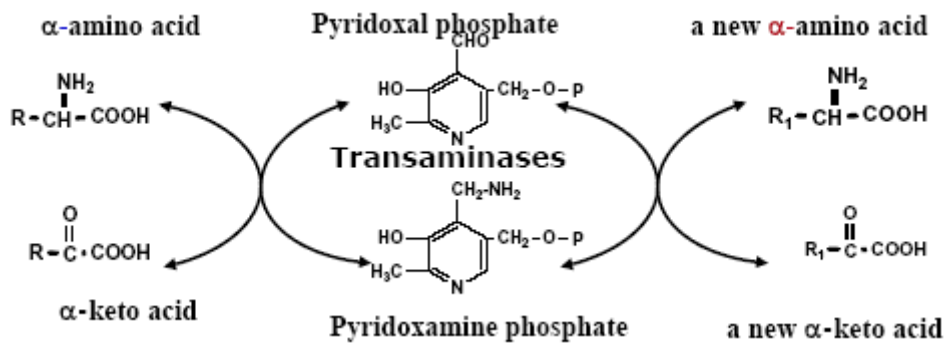
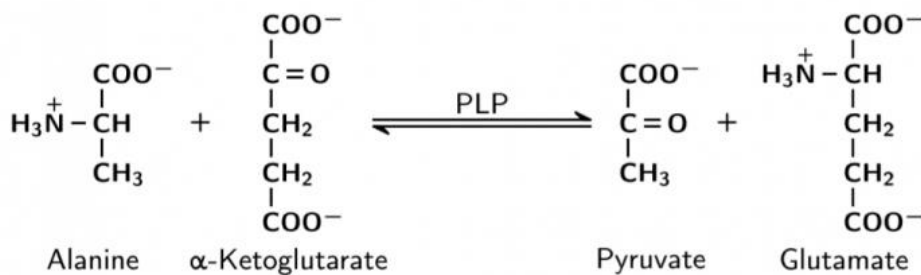


FIGURE 6 : Mécanismes de transamination.

La réaction de transamination se déroule grâce à l'intervention d'une aminotransférase et de son coenzyme le pyridoxal phosphate (PLP). Lors de cette réaction, un groupement alpha-amino d'un acide aminé est transféré à un alpha-cétoacide produisant ainsi un nouveau cétoacide et acide aminé.

Alanine aminotransferase (ALAT, ALT; Glutamate-pyruvate transaminase, GPT):



Aspartate aminotransferase (ASAT, AST; Glutamate-oxaloacetate transaminase, GOT):

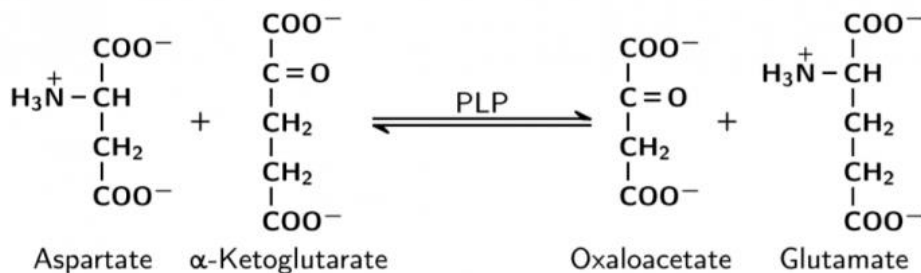


FIGURE 7 : Réaction de transamination réalisée par l'alanine aminotransférase (ALT) et l'aspartate aminotransférase (AST).

L'ALT permet la formation réversible de glutamate et de pyruvate à partir d'alanine et de l'alpha-cétoglutarate. L'AST permet la formation réversible de glutamate et d'oxaloacétate à partir d'aspartate et d'alpha-cétoglutarate.

2.3.1. La transamination

La transamination est la réaction du métabolisme des acides aminés qui intervient aussi bien dans leur catabolisme que dans leur synthèse. Ce processus conduit à un échange du groupement α -aminé entre un acide aminé et un α -cétoacide. Les enzymes qui catalysent ces réactions sont appelées les transaminases ou aminotransférases. Les réactions produites par ces aminotransférases sont réversibles et peuvent se produire dans tous les tissus. Ces réactions nécessitent un cofacteur essentiel le pyridoxal phosphate (dérivé de la vitamine B6). Dans les réactions de catabolisme des acides aminées l'accepteur du groupement α -aminé est l' α -cétoglutarate, cette réaction permet la formation d'un glutamate.

a) L'aspartate aminotransférase (AST)

L'AST est une des transaminases qui permet la conversion réversible du glutamate en α -cétoglutarate sans production d'ammonium. Chez l'homme on retrouve deux isoformes qui codent pour cette enzyme, GOT1 (cytoplasmique) et GOT2 (mitochondriale) (Altman *et al*, 2016). Elle a une expression ubiquitaire, bien qu'on la retrouve en grande quantité dans le foie et muscle cardiaque.

AST réalise une réaction réversible qui s'effectue par deux demi-réactions dans un mécanisme de cinétique de « ping-pong ». Dans un premier temps la PLP (Pyridoxal 5'-phosphate) se fixe sur l'AST et en réaction avec l'aspartate donne de l'oxaloacétate et du PMP (Pyridoxamine 5'-phosphate). Dans un second temps la PMP réagit avec l' α -cétoglutarate et régénère de la PLP accompagné d'un glutamate.

b) Alanine aminotransférase (ALT)

L'ALT permet également une transformation réversible du glutamate en α -cétoglutarate. Chez l'homme on retrouve également deux isoformes de cette enzyme GPT1 (cytoplasmique) et GPT2 (mitochondriale).

L'ALT catalyse le transfert du groupement α -aminé de l'alanine à l' α -cétoglutarate via la réaction réversible de transamination indispensable à la formation d'un glutamate et d'un pyruvate.

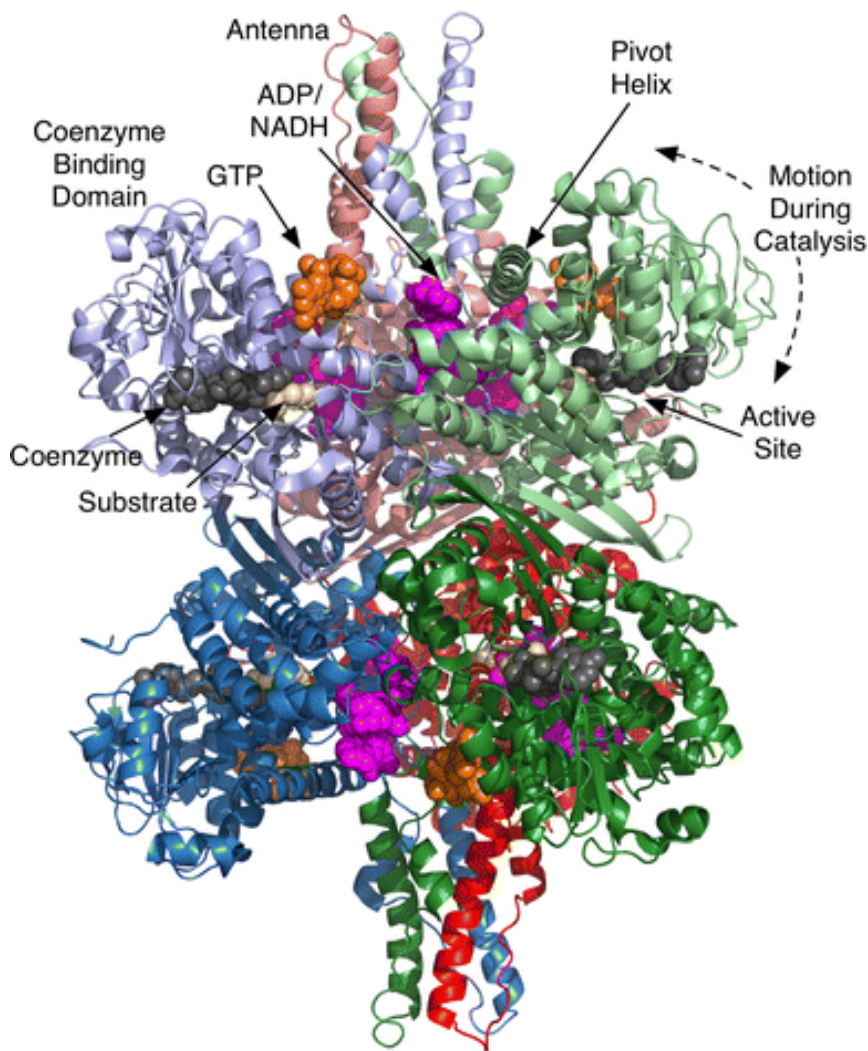


FIGURE 8 : Structure tridimensionnelle de la glutamate déshydrogénase (GDH)

Les hélices alpha et les tonneaux beta sont colorés suivant la sous-unité protéique à laquelle ils appartiennent. La flèche en pointillé représente le mouvement du domaine NAD pendant la réaction de catalyse. Les sites de liaison de GTP, NAD(P)H, glutamate et ADP sont représentés en orange, gris, jaune et violet respectivement.

D'après (Li et al., 2014)

2.3.2. La désamination oxydative

La désamination oxydative est réalisée par la glutamate-déshydrogénase (GDH). Elle catalyse la conversion réversible du glutamate en alpha-cétoglutarate et ammoniac en réduisant le NAD(P)⁺ en NAD(P)H (Smith et al., 1975). La GDH est une enzyme présente dans la matrice mitochondriale, le sens de sa réaction va dépendre de l'état énergétique de la cellule.

La GDH est exprimée chez tous les organismes vivants, chez les mammifères elle a beaucoup évolué pour devenir une enzyme hautement régulée possédant une double spécificité co-enzymatique (Engel, 2014). En effet la capacité de GDH à pouvoir utiliser aussi bien le NAD⁺ et le NADP⁺ lui permet de jouer un rôle à la fois dans les processus de catabolisme et les processus de biosynthèse.

Chez les primates, cette complexification évolutive a continué avec un événement de duplication du gène codant pour la GDH. L'homme possède donc deux protéines paralogues hGDH1 et hGDH2, chacune ayant cependant certaines caractéristiques enzymatiques différentes, comme hGDH2 qui est CK indépendante.

a) Composition et localisation

Chez les mammifères la GDH est un hexamère composé de six sous-unités identiques (Peterson and Smith, 1999). L'enzyme est composée de deux trimères accolés, qui contiennent chacun trois domaines fonctionnels, parmi lesquels on retrouve un domaine de liaison à NAD⁺ dont le site de fixation est très conservé en interspécifique, un domaine de liaison du glutamate et un domaine régulateur allostérique. Ce dernier possède une structure en antenne et hélice qui fait la jonction entre les deux trimères. Il a un rôle très important dans l'ouverture/fermeture du site catalytique et dans la conformation global de l'hexamère (Li et al., 2012).

L'enzyme GDH est surtout retrouvée dans le foie, le cerveau, les reins, le pancréas, les glandes surrénales et le placenta. Suivant les tissus d'intérêts on retrouve soit une co-expression de GDH1 et GDH2 notamment au niveau des astrocytes, soit uniquement de GDH1 comme dans le foie ou soit uniquement de GDH2 comme dans les cellules de Sertoli (Plaitakis et al., 2017).

Au niveau de sa localisation sub-cellulaire, de nombreuses études de fractionnement cellulaire ont montré que cette enzyme est retrouvée au niveau de la matrice mitochondriale. D'autres études ont montré que la majeure partie de l'activité GDH (60%) était retrouvée dans la fraction membranaire (Colon et al., 1986), même si une activité nucléaire a également été observée (Lai et al., 1986).

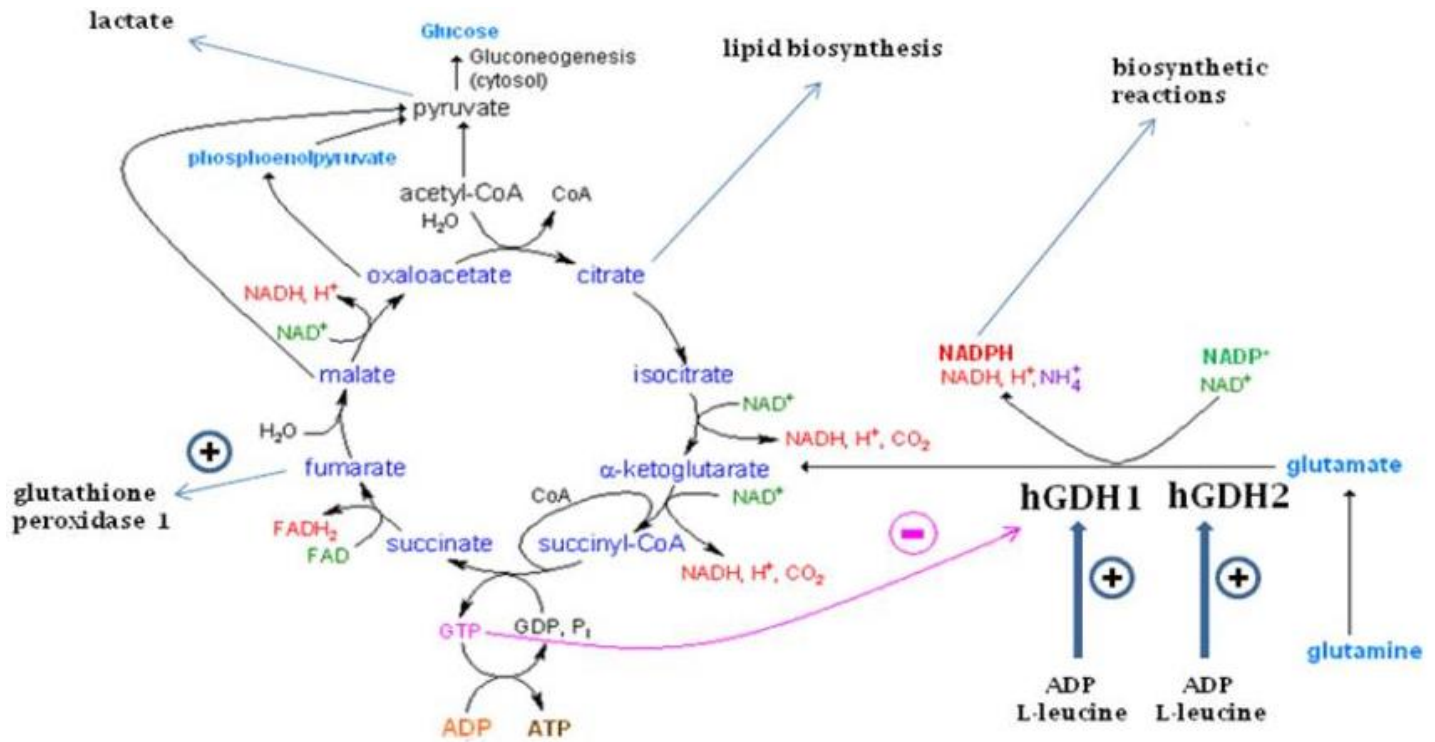


FIGURE 9 : Régulation de la glutamate déshydrogénase (GDH)

La désamination oxydative du glutamate par GDH1 et GDH2 produit de l'alpha-cétoglutarate, de l'ammoniac, du NADH ou NADPH. Le GTP produit par le CK lors de l'étape de formation du succinate inhibe fortement GDH1, empêchant ainsi au glutamate d'alimenter le CK (Nissim et al., 1999). GDH2 n'étant pas inhibé par le GTP permet alors un flux de glutamate lorsque GDH1 est inhibé. L'ADP et la leucine sont quant à eux des activateurs de GDH1 et GDH2.

D'après (Plaitakis et al., 2017)

b) Régulation

La GDH est régulée de manière allostérique via différents composés. Lors de la désamination oxydative du glutamate en alpha-cétoglutarate, il y a production de NAD(P)H, ATP et GTP. Ces constituants sont des régulateurs inhibiteurs de l'activité de la GDH. Le GTP est un inhibiteur puissant de GDH1, mais présente des effets mineurs sur GDH2 (Plaitakis et al., 2000). Le GTP provient du CK, il dérive de l'étape de formation du succinate. De ce fait le GTP est un puissant inhibiteur endogène de l'activité produisant de l'énergie. En effet, quand le CK fonctionne beaucoup il y a beaucoup de GTP produit provoquant ainsi une inhibition de la GDH1 dans le sens d'une utilisation du glutamate comme substrat énergétique pour le CK. Le fait que le GTP est un effet mineur sur GDH2 permet d'utiliser le glutamate comme substrat énergétique du CK aux niveaux de certains tissus et organes, de manière indépendante de l'état énergétique de l'organe ou de la cellule considérée. L'ADP et la L-Leucine constituent deux activateurs de la GDH. Il a été montré que l'ADP active plus fortement la GDH2 par rapport à la GDH1, 1600% contre 235% respectivement, et qu'il avait également plus d'affinité pour la GDH2 (Kanavouras et al., 2007). En revanche, la leucine active plus fortement la GDH1 par rapport à la GDH2, mais possède la même affinité. La sirtuine 4 (SIRT4), une ADP-ribosyltransférase mitochondriale inhibe également l'activité de la GDH1 en utilisant NAD⁺ pour ADP-ribosylée la GDH (Herrero-Yraola et al., 2001).

c) Fonction

Le rôle précis de la GDH n'est pas encore tout à fait délimité, mais cette enzyme régulerait le flux de glutamate dans les différents tissus. Cependant, le fait d'avoir une répartition différente de GDH1 et GDH2 suivant les tissus et organes considérés entraîne potentiellement un rôle fonctionnel différent de cette enzyme d'un tissu à l'autre et même d'une cellule à l'autre au sein du même organe.

Dans le foie, on retrouve principalement la GDH1, celle-ci assure diverses fonctions métaboliques, comme le métabolisme de l'ammoniac et l'homéostasie acido-basique (Nissim et al., 1999). Les hépatocytes sont exposés à des niveaux variables de glutamate, la fonction bidirectionnelle de GDH permet donc l'équilibre de celui-ci soit par une dégradation, soit par une production de ce métabolite.

Dans les testicules, l'expression unique de GDH2 jouerait un rôle dans le soutien et l'alimentation des cellules de Sertoli en leur fournissant du lactate qui dérive du CK via la conversion du glutamate en alpha-cétoglutarate. La GDH2 n'étant pas soumis à l'inhibition par le GTP, cela conférerait un avantage biochimique important dans le rôle de soutien de ces cellules (Spanaki et al., 2010).

Dans le rein, GDH contribue à l'homéostasie acido-basique en particulier dans les conditions de stress acide. En effet dans des conditions homéostatiques, cette enzyme serait inactivée. Cependant, lors d'un stress acide, elle serait activée dans le sens d'une désamination conduisant ainsi à une production d'ammoniac.

Dans le cerveau la régulation du métabolisme du glutamate via la GDH est très importante pour l'homéostasie énergétique et pour les mécanismes de transmission synaptique, notamment dans l'excrétion du glutamate par les neurones. Comme vu précédemment le cerveau possède à la fois une expression de GDH1 (astrocytaire), mais également de GDH2 (neuronale). Cette double expression confère à cet organe un avantage, notamment dans des périodes de demande énergétique accrue et de transmission synaptique. Lors d'une augmentation des besoins énergétiques, les taux d'ADP augmentent, les niveaux de GTP diminuent et dans ce cas GDH fonctionne dans le sens d'une désamination oxydative du glutamate en alpha-cétoglutarate, permettant ainsi d'augmenter le CK et donc par ce fait de produire plus énergie.

Une étude utilisant des souris KO pour Glud1, gène permettant la synthèse de GDH1 a montré qu'en absence de glucose, les souris KO pour GDH1 présentaient une forte réduction du métabolisme du glutamate (Hohnholt et al., 2018).

Une autre étude portant sur des souris KO pour Glud1 à montrer que la diminution de l'activité de la GDH ne modifie pas la transmission synaptique (Frigerio et al., 2012), a contrario, une surexpression de GDH entraîne une augmentation de l'excrétion de glutamate par les neurones, associée à une perte neuronale et une diminution de l'activité synaptique (Bao et al., 2009).

d) **GDH et Pathologies**

Plusieurs maladies sont liées à une dysfonction et/ou un dérèglement de la GDH. La plus connue est le syndrome d'hyperinsulinisme/hyperammoniémie (HI/HA) où l'on retrouve des mutations dans la partie régulatrice du gène Glud1, rendant l'enzyme résistante à l'inhibition de GTP (Stanley et al., 1998). Chez ces patients on retrouve une hypoglycémie à la suite d'un repas riche en protéines, il a également été décrit des symptômes au niveau du système nerveux comme des crises d'épilepsies, un retard mental et une dystonie (Raizen et al., 2005).

Au niveau de la pathogénèse des crises épileptiques, une diminution de l'activité de la GDH dans le cortex temporal de patients présentant une épilepsie du lobe temporal mésial (mTLE) a été retrouvée. Ce défaut d'activité entraînerait une diminution du métabolisme du glutamate. Cette diminution provoquerait donc une accumulation intra- et extra-cellulaire de glutamate conduisant à des phénomènes d'excitotoxicités (Malthankar-Phatak et al., 2006). Une autre étude sur le cortex cérébral de patients présentant une épilepsie généralisée a montré une augmentation de l'activité de la GDH et de l'AST entraînant une accumulation d'aspartate et de glutamate.

Pour le gène Glud2, le variant c.1492T>G, qui engendre une substitution d'une alanine en sérine en position 445, va provoquer un défaut dans le domaine liant le GTP. En effet chez les patients porteurs de cette mutation à l'état hémizygote, on constate une résistance à l'inhibition médiée par GTP. Ces patients vont avoir un âge d'apparition plus précoce de la maladie de Parkinson (Plaitakis et al., 2010).

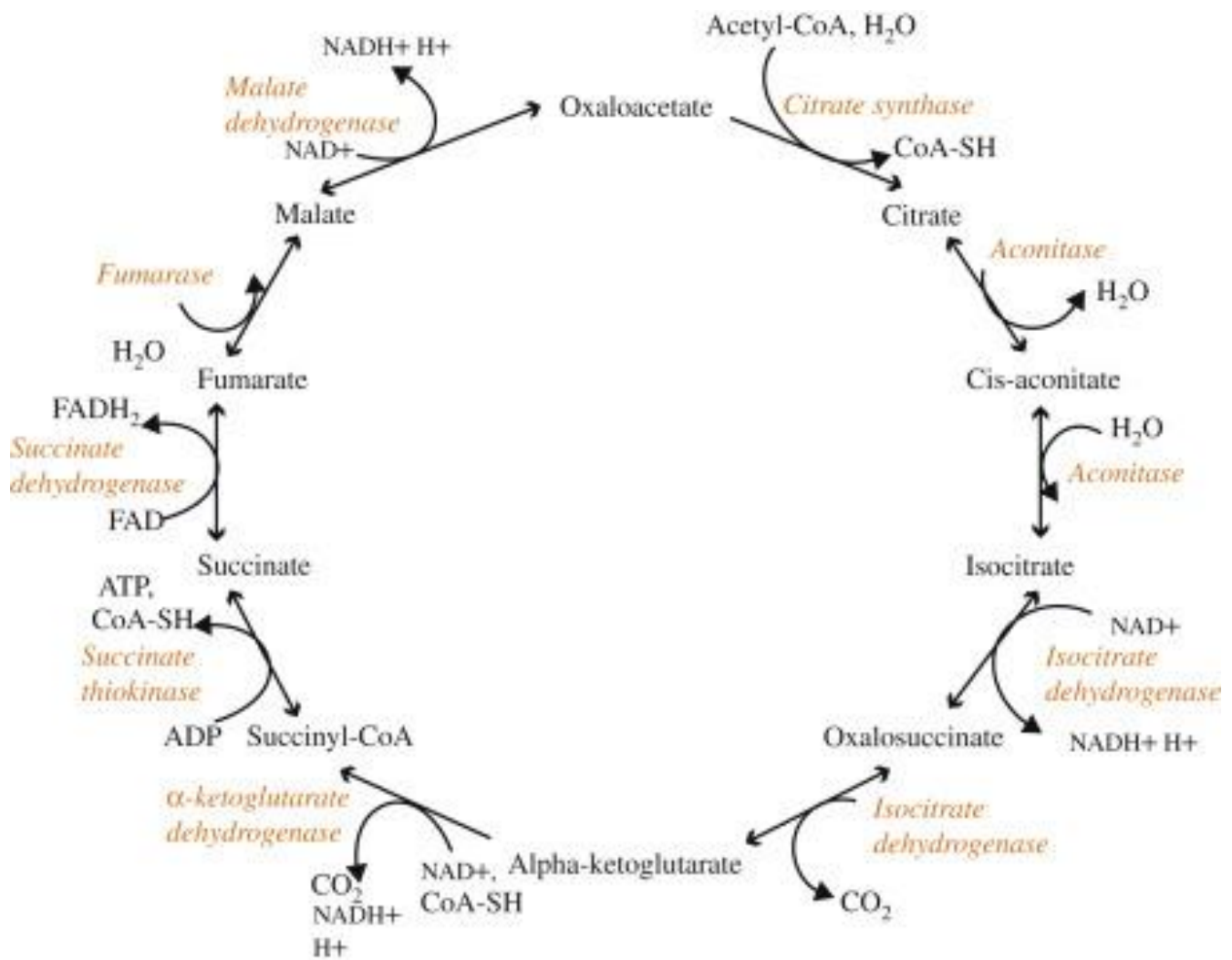


FIGURE 10 : Le cycle de krebs (CK)

Ensemble des 10 réactions enzymatiques (en orange) conduisant à la production de coenzymes réduits (NADH et FADH₂) ainsi qu'une molécule de GTP. D'après sciences direct

2.4. Le cycle de krebs

Le cycle de krebs (CK) assure la conversion de l'Acétyl CoA, produit notamment par la décarboxylation oxydative du pyruvate dans la matrice mitochondriale par la pyruvate déshydrogénase lors de la glycolyse, en 2 molécules de CO₂, 3 NADH, 1 FADH₂ et 1 GTP.

La première étape du CK est réalisée par la citrate synthase (CS) et consiste à la condensation de l'Acétyl CoA et de l'oxaloacétate pour former du citrate. La seconde étape correspond à l'isomérisation du citrate en Cis-Aconitase via une déshydratation par l'aconitase, puis réhydraté en isocitrate par l'aconitase. L'étape suivante consiste à la décarboxylation de l'isocitrate en alpha-cétoglutarate par l'isocitrate deshydrogénase. Cette étape permet la production d'une molécule de NADH et de CO₂. L'alpha-cétoglutarate est à son tour décarboxylé en succinyl-CoA par l'alpha-cétoglutarate deshydrogénase. Cette étape génère à son tour la production d'une molécule de NADH et de CO₂. Par la suite le succinyl-CoA est transformé en succinate grâce à la succinyl-coA synthétase, l'énergie produite par la liaison thioester permet la formation d'une molécule de GTP. Le succinate est déshydrogéné en fumarate par la succinate déshydrogénase permettant ainsi la formation d'une molécule de FADH₂. Le fumarate est ensuite hydraté en malate par la fumarate déshydrogénase. Le malate est quant à lui oxydé en oxaloacétate avec la production d'une molécule de NADH par la malate déshydrogénase. L'oxaloacétate étant le substrat de départ, le CK est donc prêt pour un nouveau cycle.

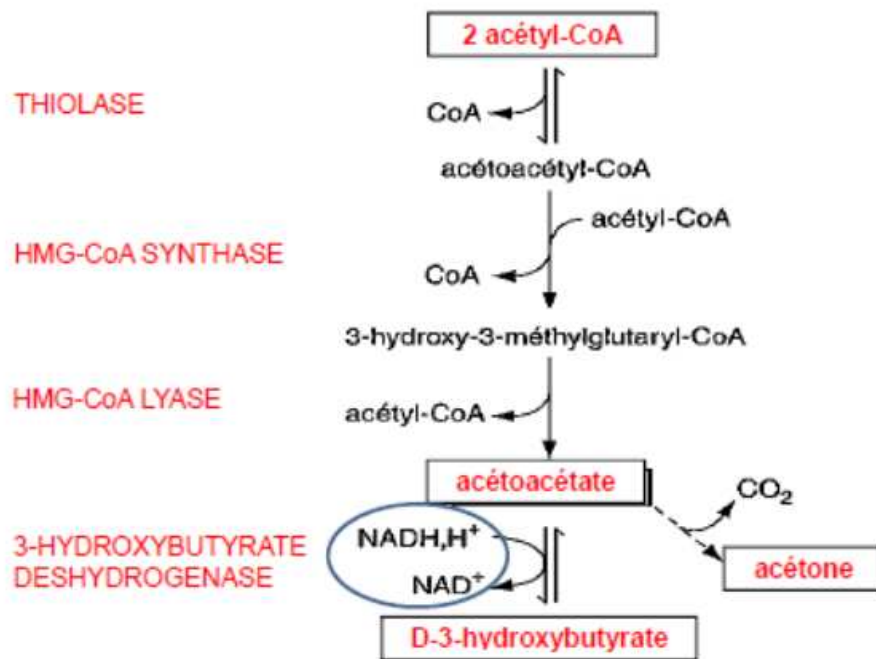


FIGURE 11 : La cétonèse

Ensemble des réactions permettant la synthèse des corps cétoniques, acétoacétate, β -hydroxybutyrate et acétone.

2.5. Les corps cétoniques

Les corps cétoniques, acétoacétate, acétone et le 3-bêta-hydroxybutyrate, sont des composants qui proviennent de la bêta-oxydation des acides gras (AG). Cette synthèse se fait à partir d'acétyl-CoA qui provient majoritairement de l'oxydation des AG mais accessoirement de quelques acides aminés cétoogènes tels que la phénylalanine, la tyrosine, la leucine et l'isoleucine. Ce sont des substrats énergétiques importants pour le cerveau et les muscles. En effet, il a été montré que notamment dans des cas de jeûnes prolongés les corps cétoniques ainsi que le lactate étaient utilisés comme substrats de secours pour le cerveau (Amiel, 1995). Leur synthèse est essentiellement réalisée au sein des mitochondries hépatiques. La combinaison de 2 acétyl-CoA, catalysée par une bêta-cétothiolase, permet la formation d'acétoacétyl-CoA. Celui-ci peut soit perdre son coenzyme A pour passer dans le sang sous forme d'acétoacétate, soit se combiner avec une autre molécule d'acétyl-CoA pour former de l'hydroxy-méthyl-glutaryl-CoA (HMG-CoA). Ce dernier composé se clive ensuite en acétyl-CoA et en acétoacétate qui passe dans le sang dans sa forme normale ou après avoir été transformé soit en bêta-hydroxybutyrate, soit en acétone.

3. La chaîne oxydative mitochondriale

3.1. Fonctionnement

Les électrons libérés lors des réactions d'oxydations provenant des différents coenzymes réduits issus de la glycolyse, de la bêta oxydation et de la dégradation des acides gras, sont transférés à un système de transport d'électrons (STE) jusqu'à un accepteur final, l'oxygène. Ce transfert d'électron, couplé à une sortie de protons vers l'espace inter-membranaire va générer un gradient électrochimique. Ce gradient représente une forme d'énergie utilisée pour la synthèse d'ATP. Le couplage de la respiration à la synthèse d'ATP porte le nom d'oxydation phosphorylante (OXPHOS).

Les OXPHOS débutent avec l'entrée des électrons au niveau des complexes I ou II. Les électrons entrent par le complexe I lors de l'oxydation du coenzyme NADH ou FADH₂ via le complexe II. Ils sont alors transférés à l'ubiquinone. La glycérol-3-phosphate déshydrogénase et l'ETF (électron-transfert-flavoprotéine) transfèrent également des électrons à l'ubiquinone. Ensuite, le complexe III transfère les électrons de l'ubiquinone réduite au cytochrome C. Les électrons sont ensuite transférés du cytochrome C à l'oxygène par le complexe IV. Ce transport des électrons est couplé à une translocation de protons, à travers la membrane mitochondriale interne, vers l'espace intermembranaire. Ce gradient de protons constitue une réserve d'énergie utilisée par le complexe V pour produire l'ATP. La chaîne oxydative mitochondriale est localisée au niveau de la membrane interne mitochondriale.

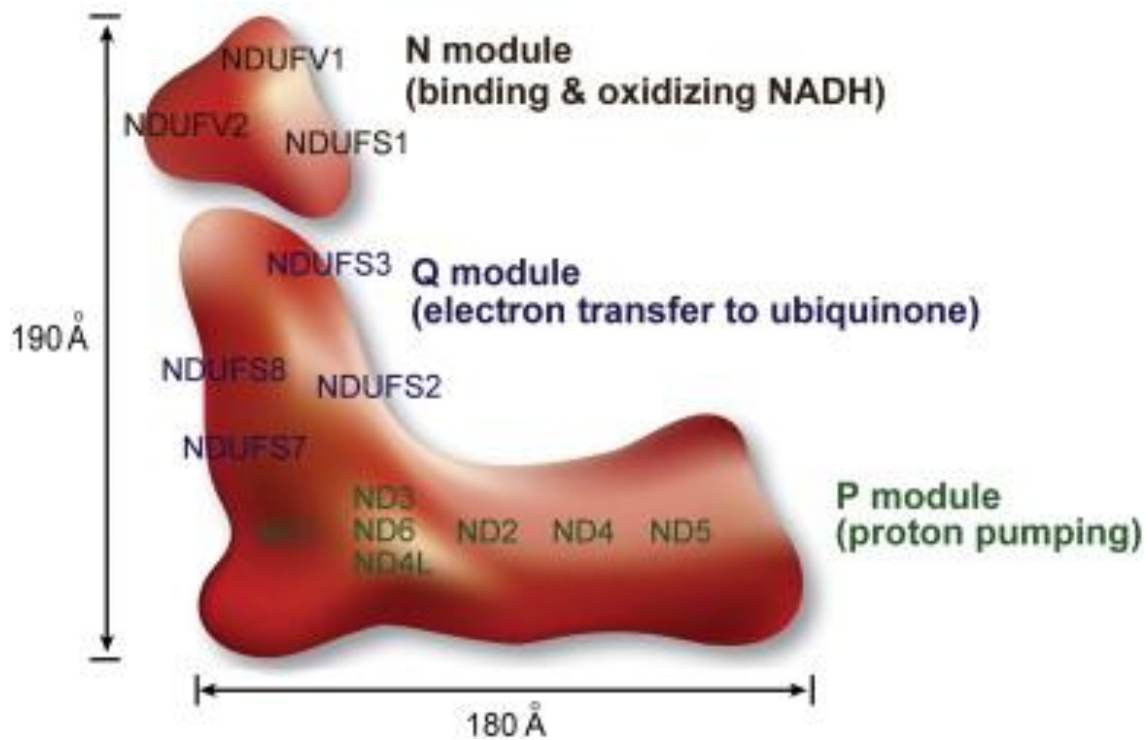


FIGURE 12 : Représentation schématique de la structure du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale

Le complexe I est composé de trois modules fonctionnels. En noir, le N module qui permet la liaison et l'oxydation du NADH. En violet, le Q module qui assure le transfert des électrons produits vers l'ubiquinone. En vert, le P module qui transfère les protons vers l'espace intermembranaire. Les sous unités représentées constituent les sous unités centrales du complexe I. D'après (Mimaki et al., 2012)

3.2. Composition

La chaîne oxydative est constituée de quatre complexes protéiques (complexe I à complexe IV), de deux transporteurs mobiles (le coenzyme Q et le cytochrome C), et enfin d'un dernier complexe responsable de la synthèse d'ATP.

3.2.1. Le complexe I : NADH Ubiquinone Oxydo-réductase

Le complexe I est le plus gros complexe de la chaîne mitochondriale. Il assure le transfert d'électrons du NADH au coenzyme Q (ubiquinone) tout en permettant le transfert de quatre protons au niveau de l'espace intermembranaire.

a) Composition du complexe I

Le complexe I est constitué de 45 sous-unités différentes codées à la fois par le génome mitochondrial et nucléaire, 7 et 38 sous-unités respectivement qui s'assemblent en une structure d'environ 1MDa (Carroll et al., 2006; Sharma et al., 2009). 14 de ces sous-unités portent le nom de sous-unités centrales en raison de leurs fonctions catalytiques conservées entre les espèces, les autres portent le nom de sous-unités accessoires. On peut diviser le complexe I en trois modules fonctionnels : le N module (site de liaison NADH), le Q module (site de liaison à l'ubiquinone) et le P module (site de pompage de protons) (Mimaki et al., 2012). Le N module lie et oxyde le NADH produisant ainsi 2 électrons transférés à une flavine mononucléotide (FMN). Ces électrons traversent un ensemble de 7 centres fer/soufre et se lient à l'ubiquinone qui constitue le Q-module. Simultanément 4 protons sont transférés vers l'espace intermembranaire par le P module.

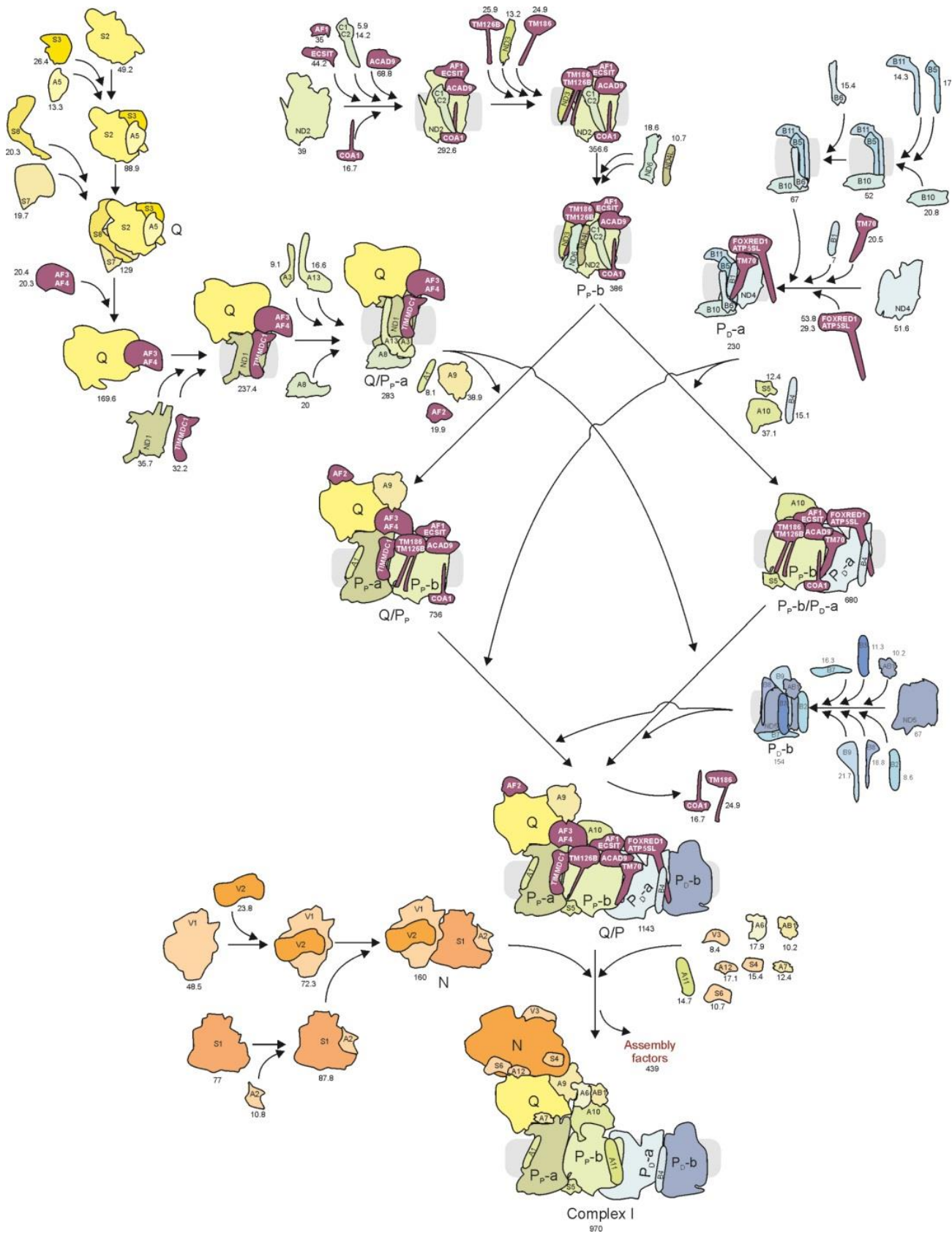


FIGURE 13 : Représentation schématique du processus d'assemblage du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. D'après (Guerrero-Castillo et al., 2017)

b) **Assemblage du complexe I**

L'assemblage du complexe I repose sur la formation indépendante de trois intermédiaires distincts : le Q-Pp-a module, le Pp-b module et le Pd-a module. Le module Q-Pp-a contient les 4 sous-unités centrales du Q module (NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8), la sous-unité accessoire NDUF5 et les facteurs d'assemblage NDUF3 et NDUF4 se fixe à la sous-unité mitochondriale ND1 ainsi que la protéine chaperonne TIMMDC1. La formation complète de cet intermédiaire est finalisée par l'ajout des sous-unités accessoires. Le module Pp-b est quant à lui composé des sous-unités ND2, ND6, ND4L et des facteurs d'assemblage NDUF1, ESCIT, ACAD9, COA1, TM126B et TM186. Le troisième module Pd-a est composé de la sous-unité mitochondriale ND4 et des sous-unités nucléaires NDUF5, NDUF6, NDUF10 et NDUF11. Par la suite le module Pp-b se fixe indépendamment avec le module Q-Pp-a ou le module Pd-a pour former respectivement le module Q/Pp ou Pp-b/Pd-a, ces modules s'associent ensuite entre et avec un intermédiaire Pd-b formant ainsi un intermédiaire d'assemblage de haut poids moléculaire, le Q/P module. Cette intermédiaire, d'environ 1150 kDa du fait de la présence de protéines chaperonnes, correspond au complexe I sans le N-module. La dernière étape de l'assemblage consiste donc à la fixation du N module au Q/P module, lors de cette étape les facteurs d'assemblage sont éjectés afin de permettre un nouveau cycle d'assemblage (Guerrero-Castillo et al., 2017).

3.2.2. Le complexe II : Succinate Ubiquinone Oxydo réductase

Le complexe II est le deuxième point d'entrée des électrons au sein de la chaîne respiratoire. Ce complexe est composé de quatre sous-unités (SDHA, SDHB, SDHC et SDHD) qui sont toutes codées par le génome nucléaire. Cette enzyme a la particularité d'appartenir à la fois au CK et à la chaîne mitochondriale. Elle catalyse la transformation du succinate en fumarate et assure le transfert de 2 électrons vers le cytochrome C. Ce complexe ne transfère aucun proton vers l'espace intermembranaire.

3.2.3. Le complexe III : L'ubiquinol cytochrome c réductase

Le complexe III transfère des électrons du coenzyme Q au cytochrome C localisé dans l'espace intermembranaire. Cela entraîne la réoxydation de l'ubiquinol en ubiquinone et la réduction du cytochrome C. Il transfère également des protons à travers la membrane.

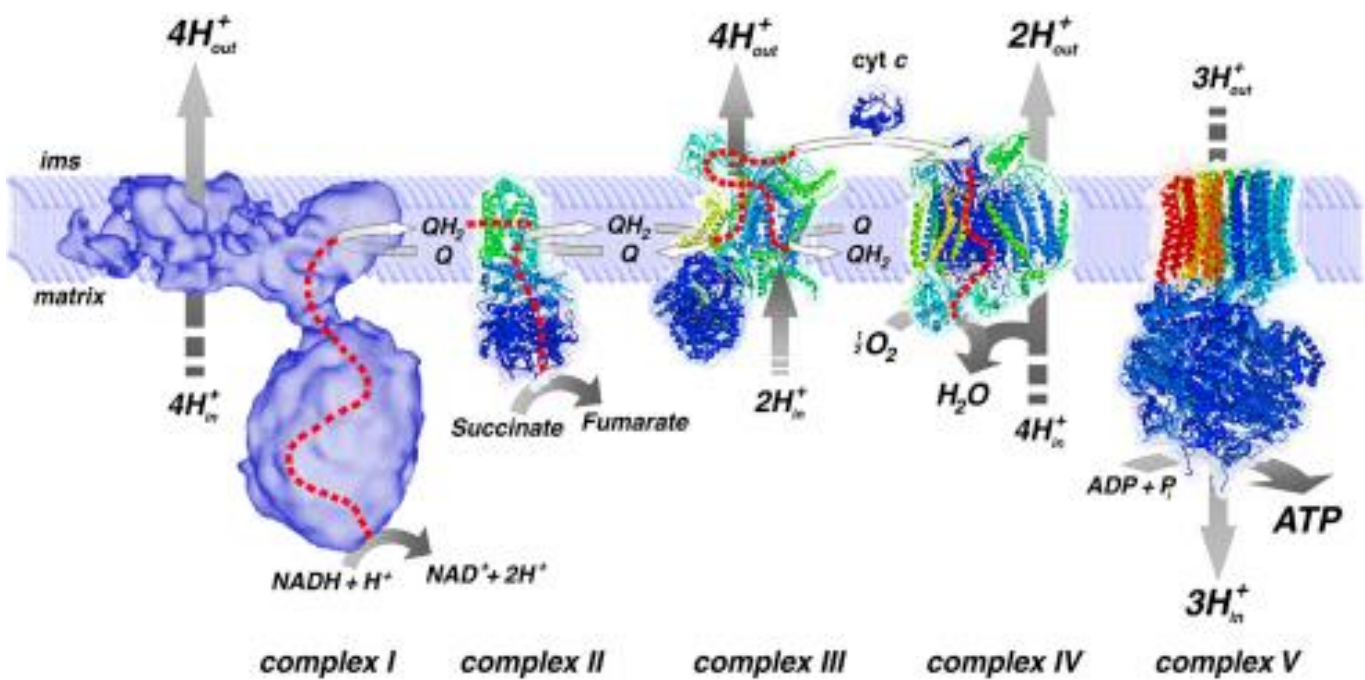


FIGURE 14 : La chaîne de la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS).

Elle est composée de 4 complexes enzymatiques enchâssés dans la membrane interne de la mitochondrie. Elle permet par un transfert d'électrons ainsi qu'un transfert de protons au niveau de l'espace intermembranaire, la formation d'un gradient électrochimique utilisé in fine par l'ATP synthase pour produire de l'ATP.

D'après (Nijtmans et al., 2004)

3.2.4. Le complexe IV : Cytochrome C oxydase

Le complexe IV contient un site de liaison avec l'oxygène lui permettant le transfert des électrons du cytochrome C vers l'oxygène pour produire de l'eau tout en oxydant le cytochrome C. Il transfère également des protons à travers la membrane.

3.2.5. L'ATP synthase

L'ATP synthase se sert du gradient de proton généré par l'ensemble des complexes qui composent la chaîne respiratoire mitochondriale pour produire de l'ATP à partir de l'ADP et du phosphate inorganique. Elle est composée des deux sous-unités F0 et F1. La première, F0 est composée de plusieurs protéines qui forment un canal protonique. La deuxième, F1 est aussi formée de différentes protéines qui lui permettent de synthétiser de l'ATP par phosphorylation de l'ADP.

4. Le génome mitochondrial

Comme vu précédemment les mitochondries dériverait d'une même origine bactérienne aussi bien pour les animaux que pour les plantes même si leurs génomes auraient évolué différemment. En effet le génome mitochondrial des plantes est relativement grand car il peut atteindre une taille de 2000kb et il comporte des régions introniques. A l'inverse, le génome mitochondrial des métazoaires est plus petit avec une taille comprise entre 14 et 20 kb et il ne contient pas d'introns (Morley and Nielsen, 2017).

4.1. Composition du génome mitochondrial humain

Le génome mitochondrial humain est composé de 16 569 paires de bases qui codent pour 37 gènes. Parmi ces derniers, seulement 13 codent pour des sous-unités de la chaîne respiratoire : 7 sont retrouvés dans le complexe I, 1 dans le complexe III, 3 dans le complexe IV et 2 dans l'ATP synthase. Les gènes restants codent pour des ARN de transfert (22 ARNt) et pour des ARN ribosomiques (2 ARNr). Néanmoins la majorité des gènes qui codent pour des protéines mitochondriales (97%) est codée par le génome nucléaire. L'ADNmt est composé des 2 brins circulaires, un brin lourd (H) et un brin léger (L) qui diffèrent de par leurs compositions. Le brin lourd est riche en guanine ce qui lui confère un poids moléculaire plus élevé et porte pratiquement l'ensemble des gènes qui codent pour les ARNm et ARNt à l'exception du gène qui code pour la sous-unité du complexe I (ND6) porté par le brin léger. L'unique région non codante de l'ADNmt correspond à la boucle de déplacement (D-Loop), qui s'étend sur 1,1 kb comportant l'origine de réplication du brin lourd et les promoteurs des 2 brins (DiMauro, 2004).

Le nombre de copies d'ADNmt par cellule est estimé à plusieurs centaines voire plusieurs milliers. Dans une cellule somatique on peut donc retrouver de 1000 à 10 000 molécules d'ADNmt. Ce nombre varie en fonction du type cellulaire ou plus généralement du tissu, en lien avec la demande énergétique. Au niveau de la matrice mitochondriale, on retrouve des structures particulières ancrées à la membrane mitochondriale interne, les nucléoïdes. Ces nucléoïdes sont des complexes protéines-ADN d'environ 100nm de diamètre chez les mammifères et où il est établi qu'on retrouve de 2 à 10 copies d'ADNmt par nucléoïde (Kukat et al., 2011).



4.2. Réplication de l'ADN mitochondrial

La réplication de l'ADNmt est simplifiée par rapport à celle qui s'effectue au niveau du noyau. Le nombre de copies d'ADNmt est dépendante de la demande énergétique tissu-spécifique. Elle est en revanche indépendante de la réplication du génome nucléaire. Deux modèles de réplication de l'ADNmt ont été proposés, un modèle asynchrone et un modèle synchrone. Dans tous les cas, la machinerie de réplication de l'ADNmt nécessite la polymérase gamma (POLG), l'hélicase Twinkle, l'ARN polymérase et des facteurs de transcription parmi lesquels on retrouve notamment TFAM.

4.2.1. Modèle de réplication asynchrone

Dans ce modèle, la réplication des deux brins d'ADN se fait de manière asynchrone et asymétrique à deux endroits distincts du génome mitochondrial. Elle débute au niveau de l'origine de réplication du brin lourd (OH), elle s'étend sur les 2/3 du brin lourd, puis atteint l'origine de réplication du brin léger (OL), qui débute alors sa réplication dans le sens opposé (Clayton, 1982).

4.2.2. Modèle de réplication synchrone

Dans ce modèle, la réplication de l'ADNmt débute dans une région proche de l'origine de réplication OH, la réplication est d'abord bidirectionnelle, puis unidirectionnelle lorsque la fourche de réplication atteint l'origine de réplication du brin OL.

Toutefois l'observation d'intermédiaires de réplication sous forme d'hybrides ADN-ARN a conduit à proposer un autre modèle très similaire au modèle de la réplication asynchrone, le modèle RITOLS (RNA Incorporated Trough Out the Lagging Stand). Dans ce modèle il y a une production d'ARNs intermédiaires lors de la réplication qui seront convertis par la suite en ADN (Holt et al., 2000).

4.3. Transmission maternelle

La transmission du génome mitochondrial se fait de manière non mendélienne, exclusivement d'origine maternelle. Il existe différents mécanismes pour éliminer l'ADNmt paternel lors des stades précoces de l'embryogenèse. D'abord par un mécanisme « passif », à savoir la dilution du faible nombre de mitochondries portés par le spermatozoïde dans l'ovocyte. En effet on estime à environ quelques dizaines de copies d'ADNmt dans le spermatozoïde, contre plus de 100 000 dans l'ovocyte (Wolff and Gemmell, 2008). A cela s'ajoute des mécanismes « actifs » comme la dégradation des mitochondries paternelles dans l'ovocyte par allophagie (Rawi and Galy, 2012).

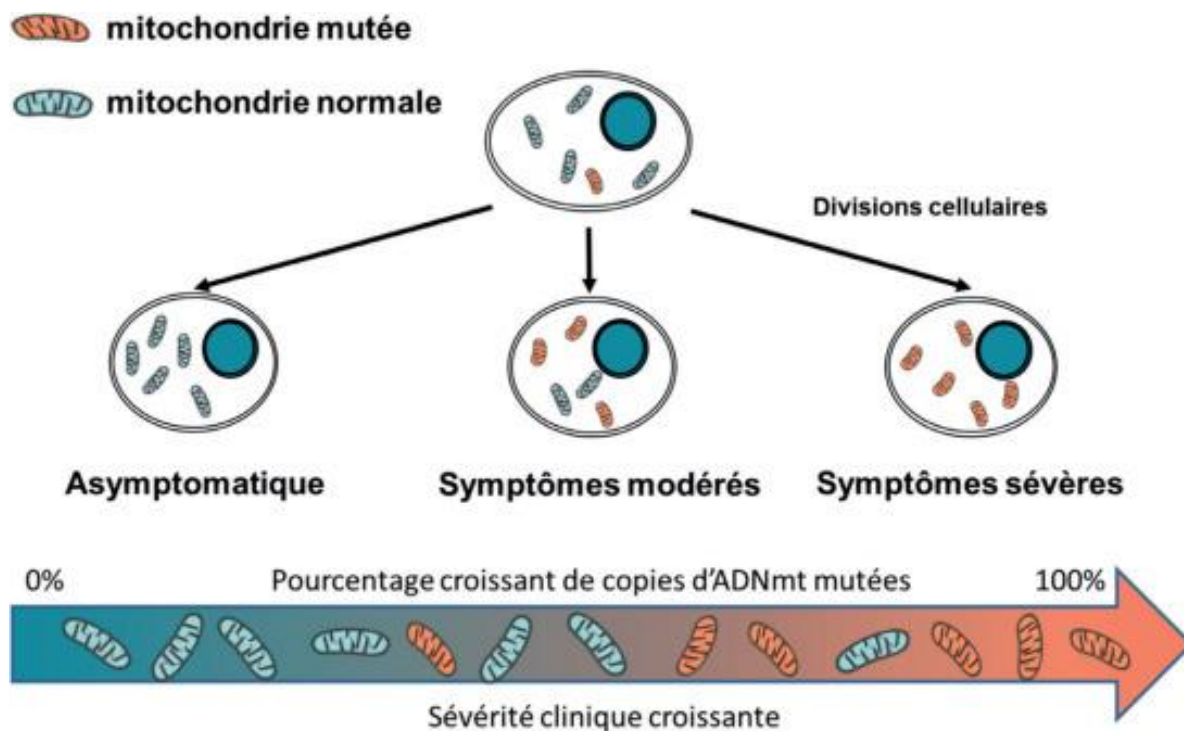


FIGURE 16 : Le concept de la ségrégation mitochondriale et de l'hétéroplasmie.

Au sein d'une cellule, plusieurs mitochondries sont retrouvées, si une mutation apparaît au niveau d'une mitochondrie on obtient alors une cellule possédant à la fois des mitochondries saines (bleu) et mutées (rouge).

Ce phénomène porte le nom d'hétéroplasmie mitochondriale. Lors des divisions cellulaires, la ségrégation mitotique aléatoire va faire varier l'hétéroplasmie entre les cellules, entre les organes et entre les tissus de l'organisme. Le phénotype pathologique va dépendre de ce niveau d'hétéroplasmie. En effet, lorsque le nombre de mitochondries normales n'est plus suffisant, on aura apparition de la symptomatologie. On parle ici d'effet seuil. La sévérité clinique est donc en lien avec l'hétéroplasmie et le type de mutation, mais plus l'hétéroplasmie augmente plus la sévérité clinique augmente.

D'après (Bris et al., 2018)

4.4. Concept de l'hétéroplasmie et ségrégation mitotique

Les cellules possèdent de nombreuses mitochondries et donc plusieurs copies d'ADNmt. Le mécanisme de réplication des mitochondries est indépendant de la réplication nucléaire. Il est moins performant au niveau des systèmes de réparation, d'où l'apparition de mutations mitochondriales. En effet, de part son rôle dans la production d'énergie, la mitochondrie est en lien étroit avec les variations environnementales. Il faut donc qu'elle puisse rapidement s'adapter à des « pressions de sélection énergétique » malgré une transmission sans brassage génétique. Ce besoin d'adaptabilité se retrouve dans sa flexibilité mutationnelle. En effet, sa réplication et ses systèmes de réparation sont beaucoup moins performants que ceux du génome mitochondrial. La mitochondrie a ainsi un taux de mutation 10 fois supérieur au génome nucléaire (Jardel and Rucheton, 2018). Lorsque toutes les molécules d'ADNmt sont identiques on parle d'homoplasmie. Si on a coexistence à la fois de copies d'ADNmt sauvages (non mutés) et mutés, on parle d'hétéroplasmie (Wallace et al., 2010). L'hétéroplasmie d'une cellule peut varier de 0 à 100%. La cellule peut présenter un faible taux d'hétéroplasmie et avoir un phénotype tout à fait normal. Lorsque le seuil de mutation est atteint, on voit apparaître un phénotype clinique en lien avec les différents symptômes liés à la mutation (effet seuil). Lors des divisions cellulaires les molécules d'ADNmt sont réparties de manière aléatoire entre les cellules filles, si bien que des variations de l'hétéroplasmie sont possibles d'une cellule à l'autre ou d'un organe à l'autre, ce phénomène est appelé ségrégation mitotique.

5. Les pathologies mitochondriales

Le terme pathologies mitochondriales fait référence à un défaut de la chaîne respiratoire mitochondriale, mais aussi à des désordres des voies bioénergétiques (DiMauro, 2004). C'est en 1962 que la première évidence biochimique a été rapportée chez une jeune femme qui présentait un hypermétabolisme non thyroïdien, avec un découplage de la chaîne respiratoire et des mitochondries anormales (Luft et al., 1962). En 1964, il fut décrit pour la première fois une myopathie mitochondriale. En effet des études histochimiques sur du muscle d'un patient présentant une fatigue et une intolérance à l'effort, ont révélés une prolifération excessive de mitochondries anormales (Shy and Gonatas, 1964). Ces accumulations mitochondriales ont été désignées par le terme RRF (ragged red fibers ou fibres rouges déchiquetées). Elles servent de marqueur pathologique dans les myopathies mitochondriales. Par la suite, ces dernières ont été étendues à des tableaux cliniques plus larges qui ont en commun des altérations qualitatives et/ou quantitatives des mitochondries dans les muscles associés à des signes neurologiques. Parmi eux, on retrouve le syndrome MELAS (Mitochondrial-Encephalopathy-Lactic Acidosis-Stroke like episodes), le syndrome de Leigh ou encore la maladie de Leber.



FIGURE 17 : Représentation schématique des organes les plus touchés lors de pathologies mitochondriales avec leurs signes cliniques associés. D'après (Bris et al., 2018)

Les mitochondries étant présentes dans toutes les cellules de l'organisme, un déficit de la chaîne mitochondriale peut s'exprimer de manière multi-systémique. En effet, les dysfonctionnements de la chaîne mitochondriale peuvent atteindre différemment les organes et les tissus de l'organisme et donc provoquer des symptômes variés. Cette hétérogénéité va rendre le diagnostic difficile même si les organes et tissus les plus touchés vont être ceux ayant une forte demande énergétique comme le cerveau, le cœur ou les muscles.

Les symptômes associés les plus fréquemment retrouvés sont donc les cardiomyopathies, les atrophies optiques, les déficiences intellectuelles, les épilepsies, les encéphalopathies, les diabètes ou encore les surdités. Les pathologies mitochondriales peuvent apparaître à tout âge, même si la majorité apparaissent chez l'enfant ou le jeune adulte. De part la dépendance de la mitochondrie aux deux génomes, ces pathologies ont la spécificité d'être liées à la fois à des mutations portées par l'ADN mitochondrial et/ou par l'ADN nucléaire.

5.1. Pathologies du génome mitochondrial

On distingue trois grands types d'altérations de l'ADNmt, les mutations ponctuelles (SNPs, petites insertions et délétions), les délétions simples ou multiples, les duplications et les déplétions qui sont une diminution du nombre de copie de l'ADNmt.

5.1.1. Les mutations ponctuelles de l'ADNmt

Les pathologies mitochondriales associées à des mutations ponctuelles de l'ADNmt sont majoritairement héritées par transmission maternelle. Ces mutations peuvent être homoplasmique ou hétéroplasmique. Les mutations hétéroplasmiques présentent des phénotypes complexes et leur sévérité est dépendante de l'hétéroplasmie mitochondriale.

a) Défaut de synthèse des protéines de la chaîne respiratoire

Ces mutations surviennent dans les gènes de l'ADNmt qui codent pour une des 13 protéines structurales de la chaîne respiratoire. Elles vont être responsables de plusieurs syndromes connus. Par exemple, la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON) qui se caractérise par une perte de la vision bilatérale due à une atrophie du nerf optique. De nombreuses mutations ont été mises en évidence dans le syndrome LHON, touchant les gènes du complexe I. Ou encore, le syndrome de NARP (neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire) qui touche des jeunes adultes et provoque des rétinites pigmentaires, des convulsions, de l'ataxie. Enfin, le syndrome de Leigh qui est retrouvé chez des jeunes enfants et qui se caractérise par une encéphalopathie sévère associée à des atteintes multisystémiques (Wallace et al, 2010).

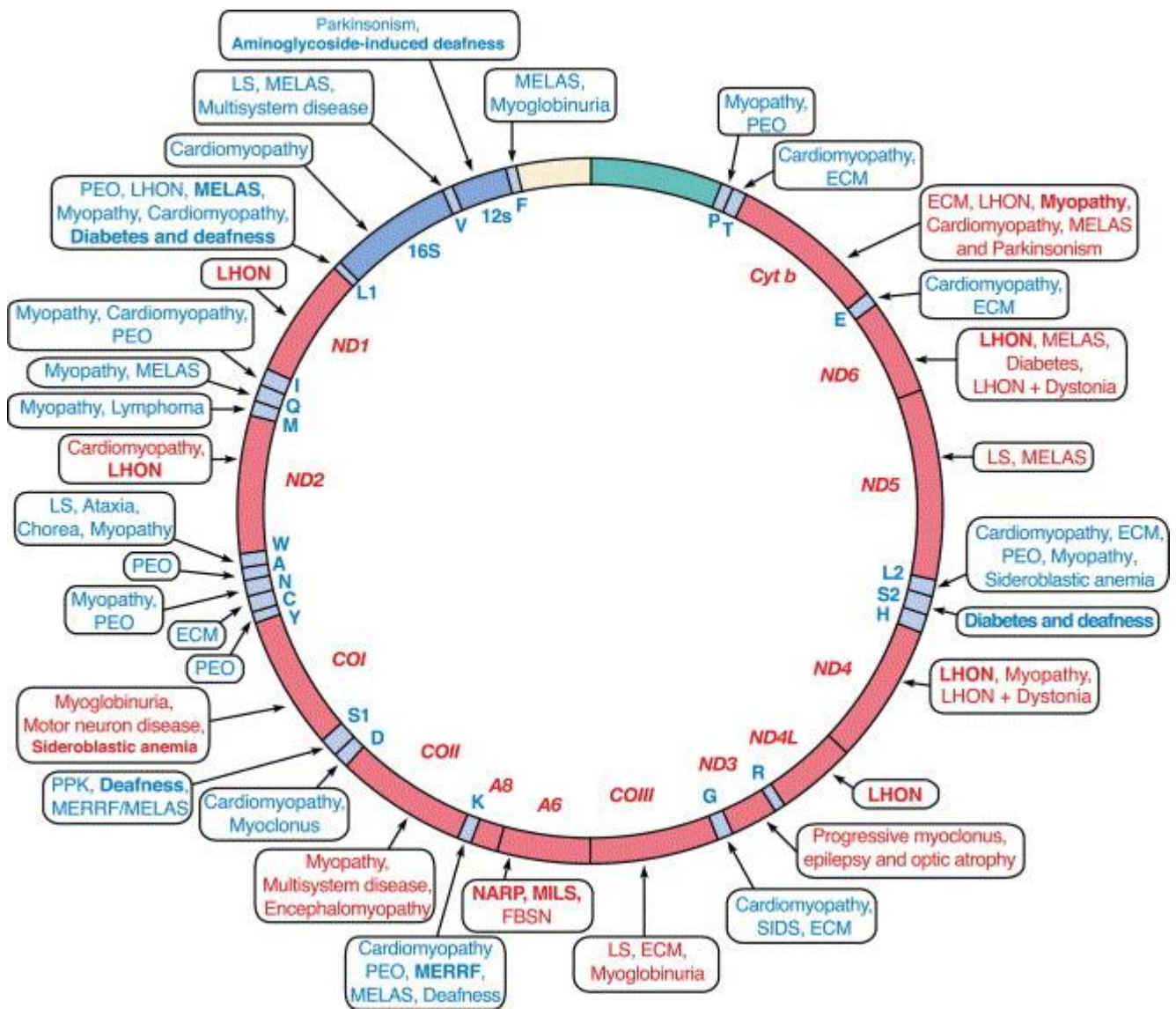


FIGURE 18 : Représentation schématique des différentes pathologies associées aux différentes mutations de l'ADNmt. D'après (DiMauro, 2004)

b) **Mutations des ARNt et ARNr**

Les mutations ponctuelles des ARNt réduisent la synthèse protéique mitochondriale dans différents tissus et organes. Parmi les principales pathologies associées à des mutations dans les ARNt, nous pouvons citer le syndrome MELAS (Mitochondrial Encephalopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episode) et MERRF (Myoclonic Epilepsy with Ragged Red Fibers) dont les mutations majoritairement retrouvées sont respectivement la m.3243A>G (ARNt leu) et la m.8344A>G (ARNt lys).

5.1.2. Les délétions uniques de l'ADNmt

Les délétions uniques de l'ADNmt sont des délétions de plusieurs kilobases (1 à 10 kb) se situant communément entre les deux origines de répliation de l'ADNmt ; impliquant donc souvent des gènes codant des sous-unités de la chaîne respiratoire et des ARNt (Wallace et al., 2010). Les délétions uniques sont sporadiques et hétéroplasmiques car elles apparaissent de novo lors de l'ovogénèse ou dans les stades précoces de l'embryogenèse. Ces délétions sont associées à trois pathologies principales : le syndrome de Pearson, le syndrome de Kearns-Sayre et l'ophtalmoplégie externe progressive.

5.2. Pathologie de l'ADN nucléaire

97% des gènes mitochondriaux étant portés par les chromosomes, la majorité des pathologies mitochondriales sont dues à des mutations de l'ADN nucléaire (Wallace et al., 2010). Parmi ces mutations on retrouve des mutations sur des gènes liés à la structure et l'assemblage des différents complexes de la chaîne mitochondriale, des gènes impliqués dans la synthèse des protéines mitochondriales ou encore des gènes responsables de la maintenance du génome mitochondrial.

mtDNA pathogenic variants: 36/37 genes					
OXPHOS subunits	(CI) <i>MT-ND1, MT-ND2, MT-ND3, MT-ND4, MT-ND4L, MT-ND5, MT-ND6</i> ; (CIII) <i>MT-CYB</i> ; (CIV) <i>MT-CO1, MT-CO2, MT-CO3</i> ; (CV) <i>MT-ATP6, MT-ATP8</i>				
Ribosomal RNA	<i>MT-RNR1</i>				
Transfer RNA	<i>MT-TA, MT-TC, MT-TD, MT-TE, MT-TF, MT-TG, MT-TH, MT-TI, MT-TK, MT-TL1, MT-TL2, MT-TM, MT-TN, MT-TP, MT-TQ, MT-TR, MT-TS1, MT-TS2, MT-TT, MT-TV, MT-TW, MT-TY</i>				
Nuclear pathogenic variants: 295 genes					
	Complex I	Complex II	Complex III	Complex IV	Complex V
OXPHOS subunits	<i>NDUFA1, NDUFA2, NDUFA6, NDUFA9, NDUFA10, NDUFA11, NDUFA12, NDUFA13, NDUFB3, NDUFB8, NDUFB9, NDUFB10, NDUFB11, NDUFS1, NDUFS2, NDUFS3, NDUFS4, NDUFS6, NDUFS7, NDUFS8, NDUFV1, NDUFV2</i>	<i>SDHA, SDHB, SDHD</i>	<i>CYC1, UQCRB, UQCRCQ, UQCRC2</i>	<i>COX4I1, COX4I2, COX5A, COX6A1, COX6B1, COX7B, COX8A, NDUFA4</i>	<i>ATP5F1A, ATP5F1D, ATP5F1E</i>
OXPHOS assembly factors	<i>ACAD9, FOXRED1, NDUFAF1, NDUFAF2, NDUFAF3, NDUFAF4, NDUFAF5, NDUFAF6, NDUFAF8, NUBPL, TIMMDC1, TMEM126B</i>	<i>SDHAF1</i>	<i>BCS1L, LYRM7, TTC19, UQCC2, UQCC3</i>	<i>CEP89, COX14, COX20, COA3, COA5, COA7, PET100, PET117, SURF1</i>	<i>ATPAF2, TMEM70</i>
Protein import & processing	<i>AFG3L2, AIFM1, CLPB, CLPP, DNAJC19, GFER, HSPD1, HTRA2, LONP1, MIPEP, PITRM1, PMPCA, PMPCB, SACS, SPG7, TIMM22, TIMM50, TIMM8A, XPNPEP3, YME1L</i>				
mtDNA replication & maintenance	<i>ABAT, DGUOK, DNA2, MGME1, MPV17, POLG, POLG2, RNASEH1, RRM2B, SAMHD1, SLC25A4, SSBP1, SUCLA2, SUCLG1, TFAM, TK2, TOP3A, TWNK, TYMP</i>				
RNA maturation/ modification	<i>ELAC2, ERAL1, FASTKD2, GTPBP3, HSD17B10, LRPPRC, MRM2, MTFMT, MTO1, MTPAP, NSUN3, PNPT1, PUS1, TRIT1, TRMT10C, TRMT5, TRMU, TRNT1</i>				
Mitochondrial aminoacyl tRNA synthetases	<i>AARS2, CARS2, DARS2, EARS2, FARS2, GARS, GATB, GATC, HARS2, IARS2, KARS, LARS2, MARS2, NARS2, PARS2, QRSL1, RARS2, SARS2, TARS2, VARS2, WARS2, YARS2</i>				
Mitoribosome	<i>MRPS2, MRPS7, MRPS14, MRPS16, MRPS22, MRPS23, MRPS28, MRPS34, MRPL3, MRPL12, MRPL44, PTCD3</i>				
Translation	<i>C12orf65, GFM1, GFM2, RMND1, TACO1, TSFM, TUFM</i>				
Membrane dynamics & composition	<i>AGK, CHKB, DNM1L, GDAP1, MFF, MFN2, MSTO1, NME3, OPA1, OXA1L, PGA2G6, PNPLA4, PNPLA8, QIL1, SERAC1, SLC25A46, STAT2, TAZ, TRAK1, VPS13C</i>				
β-oxidation	<i>ACADM, ACADS, ACADSB, ACADVL, ACAT1, CPT1A, CPT2, ETFA, ETFB, ETFDH, HADH, HADHA, HADHB, HMGCL, HMGCS2, OXCT1, SLC22A5, SLC25A20</i>				
TCA cycle	<i>ACO2, ALDH18A1, CA5A, DLAT, FH, HAAO, IDH3A, IDH3B, KYNU, MDH2, MPC1, PC, PDHA1, PDHB, PDHX, PDK3, PDP1, PPA2, SLC25A12, SLC25A13, SLC25A3</i>				
Cofactors	<i>ABC7, BOLA3, C19ORF12, COA6, COASY, COQ2, COQ4, COQ5, COQ6, COQ7, COQ8A, COQ8B, COQ9, COX10, COX15, CYCS, DLD, FDX1L, FDXR, FLAD1, FXN, GLRX5, HCCS, IBA57, ISCA1, ISCA2, ISCU, LIAS, LIPT1, LIPT2, LYRM4, MECR, MICU1, MICU2, NADK2, NAXE, NFS1, NFSU1, PANK2, PDSS1, PDSS2, SCO1, SCO2, SFXN4, SLC19A2, SLC19A3, SLC25A19, SLC25A24, SLC25A26, SLC25A32, SLC25A42, SLC39A8, TPK1</i>				
Other	<i>APOPT1, ATAD3A, C1QBP, CHCHD10, D2HGDH, ECHS1, ETHE1, FBXL4, HIBCH, IARS, L2HGDH, OPA3, RTN4IP1, SLC25A1, TMEM65, TXN2</i>				

FIGURE 19 : Liste des gènes impliqués dans des pathologies mitochondriales.

La liste des gènes associés à des pathologies mitochondriales est classée suivant leurs fonctions respectives. A ce jour grâce aux différentes avancées et notamment grâce au séquençage haut-débit (NGS), 36/37 gènes du génome mitochondrial et 295 gènes du génome nucléaire ont pu être impliqués dans une pathologie mitochondriale. D'après (Thompson et al., 2020)

5.2.1. Gènes impliqués dans la structure et l'assemblage des différents complexes de la chaîne mitochondriale

A l'inverse de l'ADNmt, le génome nucléaire code toutes les protéines du complexe II, un grand nombre des protéines composant les autres complexes de la chaîne mitochondriale, ainsi que l'ensemble des protéines intervenant dans la réplication, transcription et traduction mitochondriale.

Les déficits du complexe I sont les défauts les plus retrouvés dans les pathologies mitochondriales et ils correspondent à un éventail d'atteintes cliniques (Rötig, 2010). Parmi les plus fréquents, on peut citer le syndrome de Leigh. Actuellement 14 variants ont été identifiés dans les gènes codant pour des protéines du site catalytique, 13 variants ont été identifiés dans des gènes codant pour les sous-unités accessoires et 11 variants dans les gènes responsables de l'assemblage du complexe I (Frazier et al., 2019).

Les déficits du complexe II sont beaucoup plus rares, en effet la prévalence de défaut de ce complexe se situe entre 2 et 23% de l'ensemble des déficits de la chaîne respiratoire (Jain-Ghai et al., 2013). A ce jour moins d'une cinquantaine de cas en lien avec un défaut de structure et/ou d'assemblage du CII ont été décrits. Ces mutations se transmettent de manière autosomique récessive. On peut citer les mutations du gène SDHA qui sont responsables d'un phénotype clinique variable, avec parfois un syndrome de Leigh combiné à des atteintes multisystémiques différentes parmi lesquels on peut retrouver les symptômes suivants : ataxie, atrophie optique, crise d'épilepsie... (Birch-Machin et al., 2000; Bourgeron et al., 1995; Horváth et al., 2006; Taylor et al., 1996). Le syndrome de Leigh peut également être associés à des mutations dans le facteur d'assemblage SDHAF1 (Ghezzi et al., 2009), dans le gène codant la SDHB (Alston et al., 2012) ou dans gène codant la SDHD (Jackson et al., 2014).

Actuellement des mutations dans 4 des 10 sous-unités structurales du complexe III ont été retrouvées dans des pathologies. Parmi celles-ci on retrouve notamment des mutations dans UQCRB associées à une hypoglycémie/acidose lactique et à un tableau neurologique sévère (Barel et al., 2008; Haut et al., 2003). Concernant l'assemblage du complexe III on peut citer le gène BCS1L qui entraîne différents symptômes comme le syndrome de Bjornstad (surdité neurosensorielle et pili torti) où les patients souffrent d'insuffisance hépatique pouvant aller jusqu'à un phénotype très sévère dans le cas du syndrome GRACILE (Hinson et al., 2007; Lonlay et al., 2001; Visapää et al., 2002).

Les mutations portant sur les gènes du complexe IV peuvent être regroupées en quatre catégories suivant la fonction des gènes. Ainsi, on distingue les mutations affectant l'assemblage (SURF1), les mutations touchant le transport du cuivre (SCO1 et SCO2), les mutations engendrant des anomalies de synthèse de l'hème (COX10) et enfin des mutations sur les gènes de régulation de ce complexe IV (TACO1). Ces mutations entraînent des défaillances rénales, des cardiomyopathies et le syndrome de Leigh (Sue et al. 2000; Antonicka et al. 2003; Valnot et al. 2000). Parmi les mutations affectant le complexe V nous pouvons également citer la mutation TMEM70 qui est impliquée dans l'assemblage et qui cause des encéphalopathies (Čížková et al., 2008).

5.2.2. Gènes impliqués dans la synthèse des protéines mitochondriales

La traduction des protéines codées par l'ADNmt nécessite des ARNt et des ARNr codées par celui-ci, mais également un grand nombre de protéines codées par le génome nucléaire. En effet, parmi ces facteurs on retrouve des protéines ribosomales, des aminoacyl-ARNt synthétases, des facteurs d'initiation, d'élongation et de terminaison de la traduction (Jacobs and Turnbull, 2005). Plusieurs mutations affectant ces protéines ont été décrites. Elles impactent directement la chaîne respiratoire et engendrent de ce fait divers tableaux cliniques comme des myopathies, des encéphalopathies et/ou des insuffisances hépatiques (Patton et al., 2005; Smeitink et al., 2006b; Zeharia et al., 2009).

5.2.3. Gènes impliqués dans le maintien du génome mitochondrial

Des mutations de certains gènes nucléaires entraînent un défaut de maintenance de l'ADNmt. Cela peut engendrer une déplétion de l'ADNmt (diminution de la quantité d'ADN) ou l'apparition de délétions multiples qui affectent de manière qualitative les gènes mitochondriaux. Ces mutations sont transmises selon un mode mendélien et les gènes responsables de ces instabilités peuvent être classés en différents groupes :

- Gènes impliqués dans la réplication de l'ADNmt (POLG, POLG2...)
- Gènes impliqués dans la régulation du pool de nucléotides mitochondriaux (TP, TK2, SUCLA2, ABAT...)
- Gènes impliqués dans la dynamique mitochondriale (OPA1, MFN2...)

5.3. Diagnostic des maladies mitochondriales

A la suite des éléments cliniques, les étapes du diagnostic reposent essentiellement sur un faisceau d'arguments génétiques, histologiques et biochimiques.

5.3.1. Antécédents familiaux et symptômes

L'étude des antécédents familiaux pour les patients suspectés de maladie mitochondriale est une étape cruciale du diagnostic. En effet certains symptômes sont évocateurs de maladie mitochondriale, parmi ceux-ci nous pouvons citer, la surdité, l'atrophie optique, les troubles mentaux, l'intolérance à l'effort, le diabète...

5.3.2. Examens paracliniques

A la suite de l'évaluation des signes cliniques, des examens paracliniques peuvent être pratiqués pour montrer des anomalies évocatrices de la maladie. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) cérébrale permet d'orienter le diagnostic, et certaines lésions permettent de définir le syndrome associé. C'est le cas du syndrome de Leigh où l'on retrouve des lésions nécrotiques bilatérales des noyaux gris centraux. Dans le syndrome MELAS on observe des accidents vasculaires cérébraux transitoires ne se limitant pas qu'au territoire vasculaire et qui affectent principalement la substance grise (Ito et al., 2008). La spectroscopie permet de compléter l'IRM en mettant en évidence des anomalies de répartition de spectres. Parmi ces anomalies la présence d'un pic de lactate anormalement élevé dans des zones pathologiques peut évoquer une pathologie mitochondriale.

5.3.3. Examens métaboliques

Une hyperlactémie persistante ($> 2.5\text{mM}$), une élévation du rapport lactate/pyruvate ($L/P > 20$) reflétant le statut d'oxydoréduction cytoplasmique et le rapport des corps cétoniques 3-hydroxybutyrate/acétoacétate (>2) reflétant le statut d'oxydoréduction mitochondrial, entraîne une suspicion de maladie mitochondriale. Ces dosages doivent être réalisés au repos, à différents moments de la journée, à jeûn ou au cours d'un cycle rythmé par des repas. L'importance du choix du liquide biologique est cruciale pour la pertinence de la maladie (sérum, urines ou liquide céphalo-rachidien).

5.3.4. Analyse tissulaire

L'analyse de la morphologie des mitochondries sur biopsie musculaire est une étape clé du diagnostic des maladies mitochondriales. Elle se compose d'analyses histo-enzymologiques telles que la cytochrome C oxydase (COX), la succinate déshydrogénase (SDH). Dans de très nombreux cas on retrouve également la présence de fibres ragged red fibers (RRF) par coloration au trichrome de Gomori, mettant en évidence une prolifération mitochondriale accrue.

L'analyse enzymologique permet de mettre en évidence des déficits de la chaîne mitochondriale (CR). Elle se réalise si possible sur un tissu atteint (muscle, foie...). Elle se compose d'une étude en polarographie et d'une étude par spectrométrie qui fournissent des informations différentes mais complémentaires sur l'état de la CR. La spectrométrie dose l'activité enzymatique des différents complexes de la CR de manière isolée ou combinée. Elle est réalisée à partir d'homogénats de tissus (frais ou congelés) obtenus à partir de biopsies hépatiques, endomyocardiques, rénales ou de fibroblastes. L'oxygraphie quant à elle nécessite du tissu frais et est donc réalisable directement après biopsie. Elle permet de mesurer la consommation en oxygène des mitochondries isolées ou de fragments tissulaires perméabilisés en présence des différents substrats oxydatifs.

5.3.5. Analyse génétique

La recherche de mutations ponctuelles de l'ADNmt peut se faire à partir d'ADN extrait de sang mais l'analyse de tissus ou de cellules uro-épithéliales est recommandée. En effet le sang de par sa propriété de renouvellement rapide n'est pas le meilleur tissu pour observer l'hétéroplasmie. De plus le prélèvement des cellules uro-épithéliales est moins invasif pour le patient et donne une bonne représentation de l'hétéroplasmie. La recherche de gènes candidats peut également être guidée par les études histochimiques et biochimiques préalables. L'apparition des nouvelles technologies comme le NGS (Next Generation Sequencing) a permis d'augmenter de manière importante le nombre de découverte de variants pathologiques. De ce fait le séquençage haut-débit s'est imposé comme une technique incontournable pour un grand nombre de centres de diagnostic de pathologies mitochondriales.

5.3.6. L'essor de l'utilisation des technologies OMICs dans le diagnostic des pathologies mitochondriales

a) La génomique

Comme mentionné précédemment, le développement des techniques NGS a permis une expansion des découvertes de pathologies mitochondriales (Garone et al., 2018). D'un point de vue qualitatif, le NGS permet une meilleure détection du taux d'hétéroplasmie des variants de l'ADNmt que ne le permettait la méthode Sanger (Tang et al., 2013). Mais l'apport indéniable du NGS est surtout d'un point de vue quantitatif. En effet, il permet de séquencer simultanément plusieurs gènes nucléaires via la définition de panels. Ces panels de gènes ciblés ou « MitoExome » regroupent plusieurs voire l'intégralité des gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales. Au vu du nombre croissant de gènes liés à la mitochondrie et pour éviter des panels trop gros et coûteux, les techniques non ciblées comme le séquençage exome complet (WES, whole exome sequencing) sont de plus en plus utilisées. Le WES permet de ne pas passer à côté d'un gène non ciblé par un panel ou pas encore étiqueté mitochondrial. L'exome permet d'identifier des variants dans des nouveaux gènes nucléaires et donc d'augmenter le rendement diagnostique. Cependant, certaines mutations vont avoir lieu hors des exons, que se soit dans les introns ou les régions intergéniques. Or ces mutations peuvent entraîner des défauts d'épissage ou de régulation pouvant être délétères et qui ne pourront être déterminées par WES. D'où à plus long terme l'utilisation en diagnostic du séquençage génome complet (WGS).



Plusieurs limites techniques et scientifiques expliquent un rendement diagnostique incomplet (Pronicka et al., 2016). Tout d'abord, le séquençage NGS est moins performant sur les régions répétées ou riches en GC. Il va être par exemple difficile de distinguer les séquences entre des gènes paralogues ayant une forte similarité. De plus, une des étapes importantes des pipelines bioinformatiques est la priorisation des variants. Parmi les milliers (panels) ou les millions (WES et WGS) de variants détectés, il va falloir trier les variants artéfactuels, des simples polymorphismes et de ceux pouvant expliquer le phénotype clinique. Cette étape est donc la plus complexe car elle nécessite à la fois des outils bioinformatiques de prédiction d'impact performants mais également des connaissances scientifiques sur les gènes considérés. Cette limite est encore plus vraie pour le WGS où l'on comprend encore très mal le fonctionnement des régions intergénomiques.

b) **La transcriptomique**

L'essor des techniques de NGS a donc permis d'augmenter considérablement le rendement diagnostique, malgré tout environ 50-75% des patients ne reçoivent pas de diagnostic après un WES (Wortmann et al., 2015). En effet des variants peuvent être identifiés par WES mais reste des variants de signification inconnue (VUS). De plus le WES ne couvre que 2% du génome, ce qui exclue donc toutes les éventuelles variations dans les régions régulatrices non codantes qui peuvent néanmoins affecter l'expression d'un ou plusieurs gènes.

D'où l'intérêt de compléter ces outils génomiques par des techniques de séquençage des ARNs (RNAseq). Elles vont permettre d'analyser les ARNs présents à un instant « t » aussi bien d'un point de vue qualitatif que quantitatif. Au niveau qualitatif, on pourra lire la séquence d'un ARN et observer des anomalies comme des transcripts tronqués ou de fusion. Au niveau quantitatif, le nombre de molécule d'ARN séquencés sera le reflet de son niveau d'expression.

Trois modèles sont utilisés dans la recherche de variant pathogène candidat :

- L'expression du gène peut se situer en dehors de sa plage physiologique, conduisant à une expression aberrante de celui-ci
- La présence de MAE (expression mono-allélique) conduisant à l'expression d'un seul allèle.
- Le défaut d'épissage entraînant une série de variants aberrants (saut d'exon, inclusion d'exon, inclusion intronique...)

Une étude a évalué l'intérêt du diagnostic par séquençage de l'ARN dans une cohorte de patients présentant une mitochondriopathie. Cette étude a permis l'établissement d'un diagnostic moléculaire supplémentaire pour 10% de patients atteints non diagnostiqués par le WES et l'identification de nouveaux gènes candidats potentiels (Kremer et al., 2017).

c) La protéomique

La protéomique a connu un essor grâce aux techniques de spectrométrie de masse de plus en plus sensibles, rapides et précises. La mitochondrie participant à de nombreuses réactions cellulaires qui vont être impactées dans différentes pathologies, de nombreux efforts ont été consacrés à la protéomique mitochondriale. Le but étant d'obtenir une liste la plus exhaustive possible des protéines mitochondriales présentes au sein de différents tissus et pour différents organismes. La base de donnée MitoCarta recense à ce jour 1158 gènes humain codant pour des protéines mitochondriales (Calvo et al., 2016), Mitominer quant à elle en enregistre 1837 (Smith and Robinson, 2016). Malgré l'évolution de l'utilisation de la protéomique, celle-ci reste très peu utilisée comme outil de diagnostic complémentaire dans les pathologies mitochondriales. En effet aujourd'hui on recense très peu d'études utilisant cette technologie pour la validation de VUS.

d) La métabolomique

La métabolomique permet la détection, la qualification et l'identification de tous ou d'une partie des métabolites présents dans un échantillon biologique. Elle est aujourd'hui utilisée pour l'analyse d'un large spectre de maladies et ceux pour une grande variété d'échantillons biologiques (cellule, tissu, plasma, urine). Cette technique peut se faire par une approche ciblée qui consiste à analyser un petit groupe de métabolites, par une approche semi-ciblée qui visualise exclusivement une classe précise de métabolites, ou par une approche non ciblée qui analyse l'ensemble des métabolites présents dans un échantillon.

Très peu de métabolites sont utilisés aujourd'hui pour dépister les maladies mitochondriales hormis le lactate et le pyruvate. La métabolomique apparait donc comme un outil de choix pour permettre l'identification de nouveaux biomarqueurs des maladies mitochondriales aussi bien pour le diagnostic que pour le suivi des patients.

Depuis une quinzaine d'années un grand nombre d'études métaboliques ont été réalisées pour différentes maladies mitochondriales impactant diverses espèces (nématode, souris, humain) et établis sur des tissus distincts (muscle, plasma, urine, culture cellulaire...).

Parmi ces études, les travaux de *Kami et al* réalisés sur des cellules cybrides d'ostéosarcomes humains 143B porteuses de la mutation MELAS montrent des changements des métabolites ainsi que des variations des apports énergétiques après traitement au pyruvate. L'exposition des cellules mutantes avec le pyruvate corrige leur profil métabolomique par rapport aux cellules contrôles, montrant ainsi l'impact du pyruvate sur le métabolisme énergétique. En parallèle ils ont démontré que le traitement par le pyruvate permet une production efficace d'ATP avec une diminution du rapport lactate/pyruvate et du rapport NADH/NAD (Kami et al., 2012).

Dans une seconde étude portant cette fois sur l'étude du métabolome urinaire de deux cohortes de patients MELAS, il a été identifié une bio-signature de 36 métabolites qui ressortaient significativement dans les cohortes MELAS par rapport aux contrôles. Ces métabolites anormaux seraient liés à un état redox modifié, au catabolisme des acides gras et au métabolisme du carbone. De plus du fait de la redondance d'apparition de ces 36 métabolites au sein des deux cohortes MELAS, ceux-ci pourraient être utilisés comme marqueurs diagnostics de la pathologie MELAS (Esterhuizen et al., 2019).

Enfin dans une troisième étude portant sur l'analyse de différentes pathologies mitochondriales, une réduction du taux d'arginine a été retrouvée à la fois chez des patients MELAS que chez des MIDD (Maternally inherited diabetes and deafness) (Buzkova et al., 2018). Ce résultat avait déjà été retrouvé précédemment chez des patients MELAS (Koga et al., 2005). Cette étude a également montré plusieurs voies significativement modifiées dans le syndrome MELAS, notamment la voie de transsulfuration (métabolisme de la cystéine et méthionine), la voie de biosynthèse des acides aminés (alanine, aspartate et glutamate).

POSITION	LOCUS	PATHOLOGIES	ALLELE	NUCLEO	AA	HO	HE
3376	MT-ND1	LHON MELAS overlap	G3376A	G-A	E-K	+	+
3697	MT-ND1	MELAS / LS	G3697A	G-A	G-S	+	+
10158	MT-ND3	LS / MELAS	T10158C	T-C	S-P	+	+
13094	MT-ND5	Ataxia+PEO / MELAS, LS, LHON	T13094C	T-C	V-A	+	+
13513	MT-ND5	LS/ MELAS / LHON-MELAS Overlap Syndrome	G13513A	G-A	D-N	-	+
13514	MT-ND5	LS / MELAS	A13514G	A-G	D-G	-	+
14864	MT-CYB	MELAS	T14864C	T-C	C-R	-	+
583	MT-TF	MELAS / MM & EXIT	G583A	tRNA Phe		-	+
1630	MT-TV	MNGIE-like disease / MELAS	A1630G	tRNA Val		-	+
1644	MT-TV	LS / HCM / MELAS	G1644A	tRNA Val		-	+
3243	MT-TL1	MM / MELAS / SNHL / CPEO	A3243T	tRNA Leu (UUR)		-	+
3256	MT-TL1	MELAS	C3256T	tRNA Leu (UUR)		-	+
3258	MT-TL1	MELAS / Myopathy	T3258C	tRNA Leu (UUR)		-	+
3260	MT-TL1	MMC / MELAS	A3260G	tRNA Leu (UUR)		-	+
3271	MT-TL1	MELAS / DM	T3271C	tRNA Leu (UUR)		-	+
3291	MT-TL1	MELAS / Myopathy	T3291C	tRNA Leu (UUR)		-	+
4332	MT-TQ	Encephalopathy / MELAS	G4332A	tRNA Gln		-	+
4450	MT-TM	Myopathy / MELAS / LS	G4450A	tRNA Met		-	+

Tableau 1 : Tableau des différentes mutations retrouvées dans le syndrome MELAS.

MELAS (Melas Encephalopathy and Lactic Acidosis Syndrome) - LHON (Leber Hereditary Optic Neuropathy) - LS (Leigh Syndrome) - MM (Mitochondrial Myopathy) - Ho (homoplasmie) - He (heteroplasmie)

6. Le syndrome MELAS

Le syndrome MELAS (mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) est la pathologie mitochondriale de transmission maternelle la plus fréquente avec une première description de ce syndrome en 1984 (Pavlakis et al., 1984a). La prévalence exacte du syndrome MELAS est variable suivant la cohorte étudiée, 0.2/ 100 000 au Japon (Yatsuga et al., 2012), 18.4/100 000 en Finlande (Uusimaa et al., 2007), 236/100 000 en Australie (Manwaring et al., 2007). En 1990, la substitution de l'adénine en guanine en position 3243 de l'ADNmt (m.3243A>G) dans le gène MT-TL1 codant pour l'ARNt de la leucine (UUR) a été associée à ce syndrome (Goto et al., 1990). Bien que d'autres mutations touchant le complexe I ou des ARNt (Tableau 1) soient également impliqués dans des syndromes MELAS, la mutation m.3243A>G est la mutation majoritaire car elle est retrouvée dans 80% des cas.

En 1992, la caractérisation clinique du syndrome MELAS est définie. Elle repose sur la définition de trois critères invariants que sont des pseudos épisodes d'accidents vasculaires cérébraux apparaissant chez le jeune individu, une encéphalopathie caractérisée par des crises convulsives et une acidose lactique (Hirano et al., 1992).

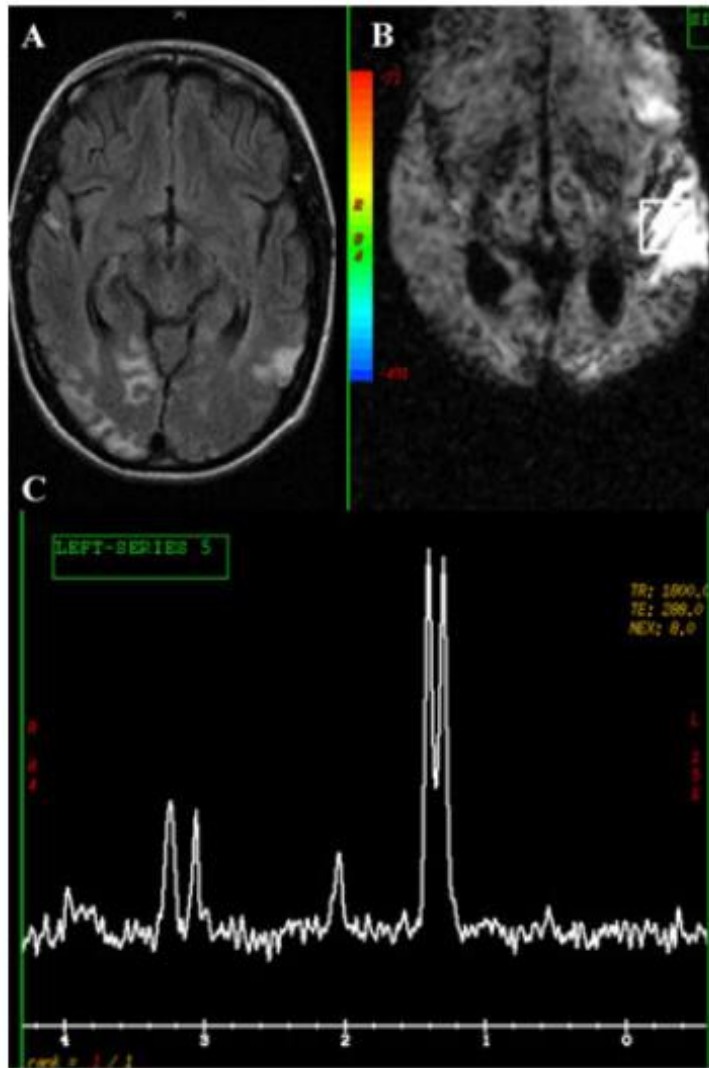


FIGURE 20 : Caractéristiques radiologiques du syndrome MELAS.

(A) Séquence d'imagerie FLAIR (Fluid-attenuated inversion recovery) montrant chez un patient des signaux dans les lobes temporaux, occipitaux et pariétaux. (B) Séquence montrant l'emplacement des voxels utilisés pour la spectroscopie IRM démontrée dans le panneau C. (C) Spectroscopie IRM montrant un grand doublet de lactate et une diminution de N-acétylaspartate. D'après (Sproule and Kaufmann, 2008)

6.1. Critères diagnostics du syndrome MELAS

Le syndrome MELAS est une pathologie multi-systémique qui se définit par un large spectre de manifestations telles que des pseudo épisodes vasculaires cérébraux, des démences, des crises d'épilepsie, des acidoses lactiques, des atteintes musculaires, des céphalées récurrentes, des diabètes et des petites tailles. Les premiers symptômes apparaissent dans la majorité des cas chez l'enfant ou jeune adulte entre 2 et 20 ans, les apparitions précoces avant l'âge de deux ans ou tardives après 40 ans représentent moins de 15% des cas (Hirano and Pavlakis, 1994).

Comme mentionné précédemment le syndrome MELAS se définit par trois critères invariants (Hirano et al, 1992) mais il peut être supporté par deux ou trois autres critères qui sont un développement anormal, des céphalées récurrentes et des vomissements récurrents. Plus récemment un groupe japonais inclut l'obligation de présenter au moins deux symptômes parmi des vomissements récurrents, des convulsions, une hémiplégie, une cécité corticale et des lésions sévères observées à l'imagerie cérébrale ainsi qu'au moins deux symptômes parmi une augmentation des lactates dans le LCR ou plasma, des mitochondries anormales à la biopsie musculaire et une mutation définitive d'un gène de l'ADNmt rapportée dans la littérature (Yatsuga *et al.*, 2012).

6.2. Aspects cliniques du syndrome MELAS

6.2.1. Manifestations neurologiques principales

Les épisodes de pseudo AVC affectent une grande majorité (plus de 80%) des individus présentant un syndrome MELAS. Lors de ces épisodes on peut retrouver une aphasie partiellement réversible, une perte de la vision corticale, une faiblesse motrice, des maux de tête, un état mental altéré et des convulsions avec une éventuelle accumulation progressive de maladies neurologiques. Le terme « pseudo » est utilisé car la distribution vasculaire en neuro-imagerie est différente d'un épisode AVC classique. Les zones les plus touchées sont le lobe temporal, pariétal et occipital. La spectrométrie par résonance magnétique montre une diminution de N-acétylaspartate et une accumulation de lactate (Sproule and Kaufmann, 2008). Les pics de lactates ventriculaires sont d'ailleurs corrélés au degré de déficience neurologique dans le syndrome MELAS.

Outre ces manifestations, on retrouve également de nombreux cas de démences en corrélation avec l'accumulation de ces pseudos AVC. Une autre manifestation neurologique très présente chez les patients est l'épilepsie. Les atteintes neurologiques principalement associées au syndrome MELAS sont les céphalées, les vomissements récurrents et les surdités.

Outre ces troubles principaux des cas psychiatriques ont également été associés au syndrome MELAS, parmi eux on retrouve la dépression, les troubles bipolaires et l'anxiété.

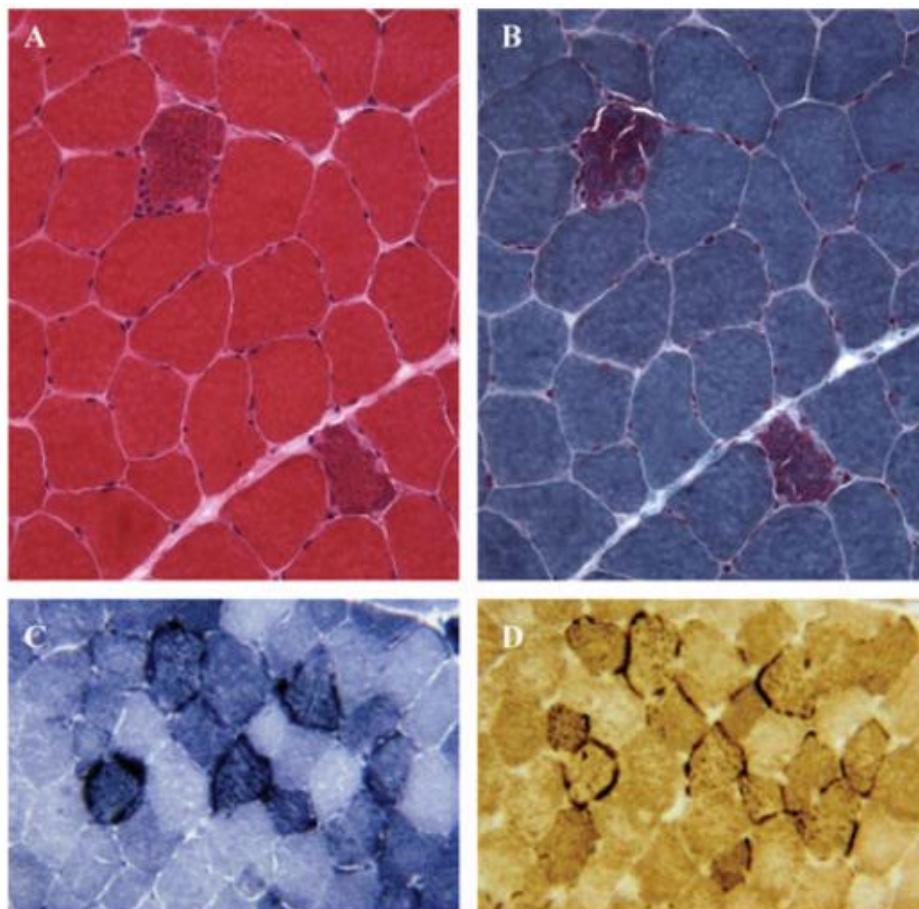


FIGURE 21 : Caractéristiques histopathologiques du syndrome de MELAS.

(A) La coloration hématoxyline-éosine. (B) La coloration trichrome de Gomori présentant des fibres rouges déchiquetées et l'accumulation de la prolifération mitochondriale. (C) La coloration à la succinate déshydrogénase montre une coloration accrue, preuve d'une prolifération mitochondriale anormale. (D) La coloration COX présentant des cellules musculaires à coloration diminuée, normale et augmentée. D'après (Sproule and Kaufmann, 2008)

6.2.2. Manifestations musculaires

L'intolérance à l'exercice et la faiblesse musculaire affectent un grand nombre de porteur du syndrome MELAS. A l'examen histologique du tissu musculaire d'un patient on retrouve la présence de fibres rouges déchiquetées. La coloration hématoxyline éosine montre des fibres musculaires vacuolées avec une bordure claire. La coloration trichrome de Gomori permet de mettre en évidence une prolifération mitochondriale importante, de même que l'incubation avec la succinate déshydrogénase. De manière intéressante contrairement à d'autres myopathies mitochondriales, la coloration des fibres musculaires avec la cytochrome oxidase (COX) peut être diminuée, normale, ou même augmentée dans les fibres rouges déchiquetées. La coloration succinate déshydrogénase montre quant à elle une coloration accrue, preuve d'une prolifération mitochondriale anormale. Ces observations laissent penser à une réduction de l'activité enzymatique de la chaîne mitochondriale avec une prolifération compensatrice des mitochondries chez les patients MELAS (Sproule and Kaufmann, 2008).

6.2.3. Acidose lactique

Un autre marqueur du syndrome MELAS est la présence d'une acidose lactique. En effet la majorité des patients présentant un MELAS présentent une hyperlactacidémie dans le plasma, mais également dans le liquide céphalo-rachidien.

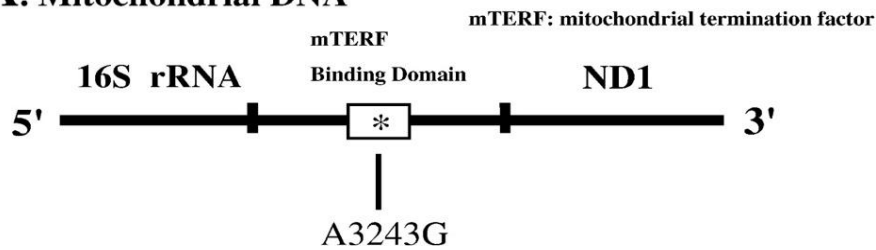
6.2.4. Autres manifestations cliniques

De nombreux cas de diabète sont retrouvés en parallèle au syndrome MELAS. L'hypothèse la plus simple de ce diabète serait le fait d'avoir chez ces patients un métabolisme du glucose altéré, mais il semblerait en fait que la cause de son apparition soit due à une dérégulation hépatique. En effet la gluconéogenèse hépatique dans un contexte d'acidose lactique et de dysfonctionnement mitochondrial entraînerait une diminution de la production d'insuline qui serait à l'origine de ce diabète.

En raison de la forte demande énergétique, on retrouve des manifestations cardiaques associées au syndrome MELAS. En effet sur une étude portant sur 110 patients MELAS, 18% présentaient soit une cardiomyopathie soit une insuffisance cardiaque (Hirano and Pavlakis, 1994).

Parmi les symptômes associés plus rarement au syndrome MELAS on retrouve également des manifestations gastro-intestinales, des manifestations dermatologiques qui incluent des changements de pigmentation et un vitiligo ainsi que des manifestations pulmonaires.

A. Mitochondrial DNA



B. Mitochondrial RNA

Ribosomal Transcript



Polycistronic Transcripts



Possible processing intermediate



FIGURE 22 : Modification post-transcriptionnelle associée à la mutation m.3243A>G.

(A) La mutation m.3243A>G présente au niveau de la partie centrale du site de fixation de la protéine mTERF.

(B) Accumulation ARN 19S correspondant à l'ARN 16S+ ARNt Leu (UUR) +ND1. D'après (Koga et al., 2012)

6.3. Physiopathologie du syndrome MELAS

Encore aujourd'hui mal comprise, la physiopathologie du MELAS peut néanmoins s'expliquer par à la fois une diminution de l'énergie mitochondriale et par ce fait une dysfonction du métabolisme oxydatif, et d'autres part une angiopathie micro-vasculaire relative à une carence en oxyde nitrique (NO).

6.3.1. Dysfonction du métabolisme oxydatif

a) Transcription de l'ARNt Leu (UUR) et MELAS

Les ARN de transfert des mammifères sont transcrits au sein d'ARN polycistroniques. Parmi ces molécules polycistroniques, les ARNt agissent comme des signaux de reconnaissance pour les enzymes qui clivent en 5' 3' des séquences précise du transcrit primaire pour obtenir des ARNm, ARNt et ARNr matures (Montoya et al., 1983). L'ARNt Leu (UUR) appartient à une unité polycistronique dans laquelle on retrouve l'ARN16S et l'ARNm de ND1. La mutation m.3243A>G se trouve dans la partie centrale du site de fixation de la protéine mTERF (mitochondrial terminal factor) impliquant un défaut de fixation de celle-ci, ainsi qu'un défaut de terminaison de la transcription (Hess et al., 1991). En effet des accumulations ARN 19S correspondant à ARN 16S+ ARNt leu (UUR)+ ND1 ont été retrouvées dans des cybrides m.3243A>G (Koga et al., 1995). Une étude a montré une accumulation de l'ARN 19S dans le muscle de 8 patients MELAS qui présentaient des taux d'hétéroplasmie variable (58 à 99%)(Koga et al., 1995). Une autre étude a montré une accumulation de cet ARN 19S dans le muscle squelettique de plus de 95% et ce malgré une hétéroplasmie variable (54 à 92%), elle suggère donc que la mutation m.3243A>G présente un effet dominant négatif (Koga et al., 2003, 1998). Cette accumulation de l'ARN 19S entraîne un défaut de synthèse protéique par deux mécanismes possibles. Soit un blocage de la traduction par l'incorporation de pseudo-ribosomes qui incorporent de l'ARN 19S au lieu du 16S, ou alors des modifications post-transcriptionnelles anormales de l'ARNt leu (UUR)(Schon et al., 1992).

b) Structure et stabilisation de l'ARNt Leu (UUR)

Le nucléotide en position 3243 est impliqué dans le repliement de la structure tertiaire de l'ARNt Leu (UUR). De ce fait, la mutation m.3243A>G, qui perturbe l'interaction entre l'adénine en position 14 et l'uracile en position 8, induit des ARNt partiellement repliés dans la structure en L avec une branche acceptrice de l'acide aminé correcte mais une branche anticodon plus souple (Sohm et al., 2003). Cette modification impacte la structure quaternaire et a ainsi un effet sur la fonction de l'ARNt mitochondrial aussi bien au niveau de la reconnaissance du codon-anticodon, que sur sa stabilisation et la diminution de son aminoacylation.

c) Synthèse protéique

Les problèmes de stabilisation et de diminution de l'aminoacylation des ARNt entraînent un défaut de la synthèse protéique mitochondriale (Chomyn et al., 2000; Schon et al., 1992). Les défauts de traduction protéique proviendraient également d'un défaut de maturation de la base wobble de l'ARNt qui perturberait l'incorporation des leucines dans les différentes protéines (Kirino et al., 2004; Sasarman et al., 2008). En effet bien que l'utilisation du codon UUG soit mineure dans la plupart des protéines, le gène ND6 codant une sous-unité du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale contient huit codons UUG constituant donc 42% des leucines totales. Une diminution nette de la traduction de la sous-unité ND6 est d'ailleurs observée dans les cellules cybrides m.3243A>G. (Kirino et al., 2004) .

Cette diminution de l'efficacité et de la fidélité de la traduction entraîne donc des défauts de la chaîne respiratoire mitochondriale avec un défaut des fonctions oxydatives et une diminution de la respiration cellulaire (Chomyn et al., 1992; Dunbar et al., 1996).

6.3.2. Angiopathie relative à une carence en NO

Bien que la pathogenèse du syndrome MELAS ne soit pas encore complètement totalement comprise, les symptômes associés peuvent cependant être expliqués par différents mécanismes : une production énergétique mitochondriale altérée, une angiopathie et une carence en oxyde nitrique (NO) (El-Hattab et al., 2015). En effet dans les tissus de patients présentant un MELAS il a été observé une prolifération et une accumulation des mitochondries dans les cellules endothéliales et musculaires lisses des petites artères du cerveau (Sakuta and Nonaka, 1989). Le NO est formé à partir de l'arginine, qui provient elle-même de la citrulline. Des études ont montré une diminution de la synthèse de NO, ainsi qu'une diminution de la citrulline et de l'arginine (El-Hattab et al., 2012a; Naini et al., 2005). Une des hypothèses avancées pour expliquer cette baisse de production en NO est qu'elle serait due à une activité COX plus importante chez les patients présentant un MELAS. En effet comme précédemment mentionné à l'examen histologique, l'endothélium et le muscle lisse présentent un marquage COX positif (Sproule and Kaufmann, 2008). Or le NO est capable de se fixer sur le site accepteur de l'oxygène au niveau de la COX (Naini et al., 2005). Cette fixation accrue de NO sur la COX entraînerait un déficit de NO libre et donc une dysfonction vasculaire pouvant provoquer des AVC (Sproule and Kaufmann, 2008). De plus, l'augmentation des ROS en lien avec les déficits de la chaîne respiratoire mitochondriale pourrait conduire à une diminution de la biodisponibilité de NO (El-Hattab et al., 2015).

6.4. Thérapies

A ce jour il n'existe malheureusement pas de traitement curatif pour les pathologies mitochondriales. On ne dispose pour le moment que de traitements symptomatiques. En effet les traitements actuels visent essentiellement à améliorer la fonction mitochondriale sans pour autant traiter la maladie. Actuellement, les traitements proposés aux patients vont être de deux types, soit symptomatiques soit en restaurant la fonction énergétique via l'utilisation d'un « cocktail mitochondrial » (antioxydants, énergétique, biogénèse mitochondriale).

6.4.1. Aspects thérapeutiques

a) Traitements symptomatiques

Les traitements symptomatiques permettent surtout d'améliorer la qualité de vie des patients. La gestion de la maladie est patient-dépendant et nécessite la collaboration de nombreux professionnels de santé parmi lesquels on retrouve des neurologues, des endocrinologues, des cardiologues, des orthophonistes, des physiothérapeutes et des otorhinolaryngologues. Par exemple, la surdité peut être corrigée par l'implantation d'un implant cochléaire (Scarpelli et al., 2012).

Les patients atteints d'une maladie mitochondriale présentent généralement une intolérance à l'exercice. L'exercice physique qui peut être bénéfique pour ces patients va donc lui aussi faire partie du traitement. Cet exercice physique peut être décomposé en deux composantes : l'exercice de résistance et l'exercice d'endurance. Les exercices de résistance permettent d'activer la prolifération des cellules satellites du muscle squelettique. Les cellules satellites présentant un plus faible niveau d'hétéroplasmie muté que les fibres musculaires, la fusion de ces dernières permet de réduire la charge mutationnelle et donc d'augmenter la capacité oxydative chez les patients (Taivassalo et al. 2001; J. L. Murphy et al. 2008). Plus spécifiquement associés à la physiopathologie du MELAS, les exercices d'endurance peuvent également être proposés afin d'induire une biogénèse mitochondriale dans les cellules satellites des muscles (Taivassalo and Haller, 2004). De leur côté, les exercices d'endurance permettent d'induire une plus grande capacité OXPHOS et antioxydante. En effet une étude a montré qu'après 12 semaines d'entraînement, on observait une augmentation de la VO₂max, de la citrate synthase et de la quantité ADNmt musculaire chez les patients. En revanche, aucune modification du taux de mutation de l'ADNmt, de l'activité enzymatique mitochondriale ou de la morphologie musculaire n'a été constatée (Jeppesen et al., 2006).

Les traitements peuvent également concernés une modification des apports nutritionnels. Nous aborderons plus en détail cette approche dans la partie régime cétogène spécifique à la physiopathologie du syndrome MELAS.

b) Traitements visant à restaurer la fonction énergétique mitochondriale

Le coenzyme Q10 demeure le traitement le plus largement utilisé dans les maladies mitochondriales. Il permet le transfert des électrons des complexes I et II au complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ses rôles thérapeutiques sont multiples, en effet il peut à la fois servir de cofacteur à la chaîne mitochondriale, mais également d'agent antioxydant. Il s'avère efficace en ce qui concerne les déficits primaires de la biosynthèse du coenzyme Q, en revanche pour les autres déficits de la chaîne respiratoire son efficacité reste plus discutable (Glover et al. 2010; Potgieter, Pretorius, et Pepper 2013). Dans la pathologie MELAS une étude a montré une amélioration de la faiblesse musculaire, suite à l'administration de coenzyme Q10. L'administration de celui-ci supplémenté avec de l'idébénone a permis de voir une diminution de lactates dans le LCR (Ihara et al., 1989). L'étude randomisée, de *Glover et al* a montré une diminution du lactate plasmatique après administration de coenzyme Q10 suivi d'un effort physique (bicyclette), néanmoins les autres mesures ne présentaient pas de différences significatives (Glover et al., 2010). L'association d'acide lipoïque dans une autre étude a également montré une diminution des taux plasmatiques de lactates (Rodriguez et al., 2007).

L'idébénone est un analogue du coenzyme Q10, d'un point de vue structural ils diffèrent au niveau de leurs chaînes latérales, celle de l'idébénone est plus petite. Cette caractéristique lui confère une meilleure perméabilisation au niveau de la barrière hémato-encéphalique et donc une absorption plus rapide. Cela explique sa plus grande efficacité par rapport au coenzyme Q10. Des études ont mis en évidence une diminution des symptômes suite à l'administration d'idébénone, notamment dans le cerveau avec une augmentation du métabolisme oxydatif. Et en combinaison avec la riboflavine, il a été montré une diminution des crises de type AVC associée à une amélioration des fonctions cérébrales (Ikejiri et al., 1996; Napolitano et al., 2000).

La créatine est une molécule endogène à haut potentiel énergétique et pour laquelle des effets antioxydants et neuroprotecteurs ont été reportés (Ferrante et al., 2000; Klivenyi et al., 1999). Pourtant son utilisation dans le cas d'un syndrome MELAS n'améliore que très peu les symptômes malgré l'observation d'une meilleure tolérance à l'exercice (Tarnopolsky, 2011).

La L-carnitine est une molécule nécessaire pour le transport des acides gras à longues chaînes vers la matrice mitochondriale où s'en suit la bêta-oxydation. Ce traitement est également proposé dans le syndrome MELAS, même si pour le moment aucune étude n'a permis d'apporter la preuve d'un réel bénéfice thérapeutique.

La L-arginine est un précurseur du monoxyde d'azote (NO), un puissant vasodilatateur. C'est pour cela qu'il est proposé par certains praticiens lors des phases aiguës chez les patients présentant des épisodes de pseudo-AVC. L'équipe de Koga a montré une nette amélioration des épisodes de pseudo-AVC ainsi que la réduction de la fréquence d'apparition de ceux-ci suite à l'administration de L-arginine (Koga et al., 2005, 2006, 2007). Le suivi de patients 7 ans après supplémentation de L-arginine pendant 2 ans, a mis en évidence une amélioration de la courbe de survie des patients si les concentrations de L-arginine plasmatique se maintiennent au moins à 168 μ mol/L (Koga et al., 2018). La citrulline est un donneur de NO plus efficace que l'arginine car elle permet une grande synthèse de l'arginine de novo (El-Hattab et al., 2012b, 2015, 2016).

La taurine est un acide β -aminé retrouvé en grande quantité dans les mitochondries. Elle permet après formation de 5-taurinométhyluridine-ARNt, de renforcer l'interaction de l'anticodon de l'ARNt avec le codon de l'ARNm permettant ainsi un bon décodage de celui-ci. Une diminution de la formation 5-taurinométhyluridine-ARNt, due à une carence en taurine, diminuerait l'efficacité de ce décodage et impliquerait donc une diminution de la biosynthèse des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale. Cela engendrerait des défauts tels qu'une réduction de la consommation d'oxygène, une augmentation de la glycolyse et une production de lactates similaire à celle retrouvée dans les maladies mitochondriales tel que le syndrome MELAS (Schaffer et al., 2014). Cette hypothèse est appuyée par Jong et al qui a montré que l'expression protéique de la sous-unité ND6 dans des cardiomyocytes déficients en taurine est réduite d'environ 40% (Jong et al., 2012). Dans un essai clinique réalisé au Japon, la taurine a été administrée pendant 52 semaines à haute dose (12g/jour) chez 10 patients MELAS qui présentaient des épisodes récurrents de type AVC. Et pour 80% d'entre eux, il a été constaté une diminution de moitié de la survenue des crises pendant toute la durée du traitement. De manière intéressante, pour cinq de ces patients, une augmentation significative de la modification taurine de l'ARNt Leu (UUR) a été également mise en évidence dans les leucocytes (Ohsawa et al., 2019).

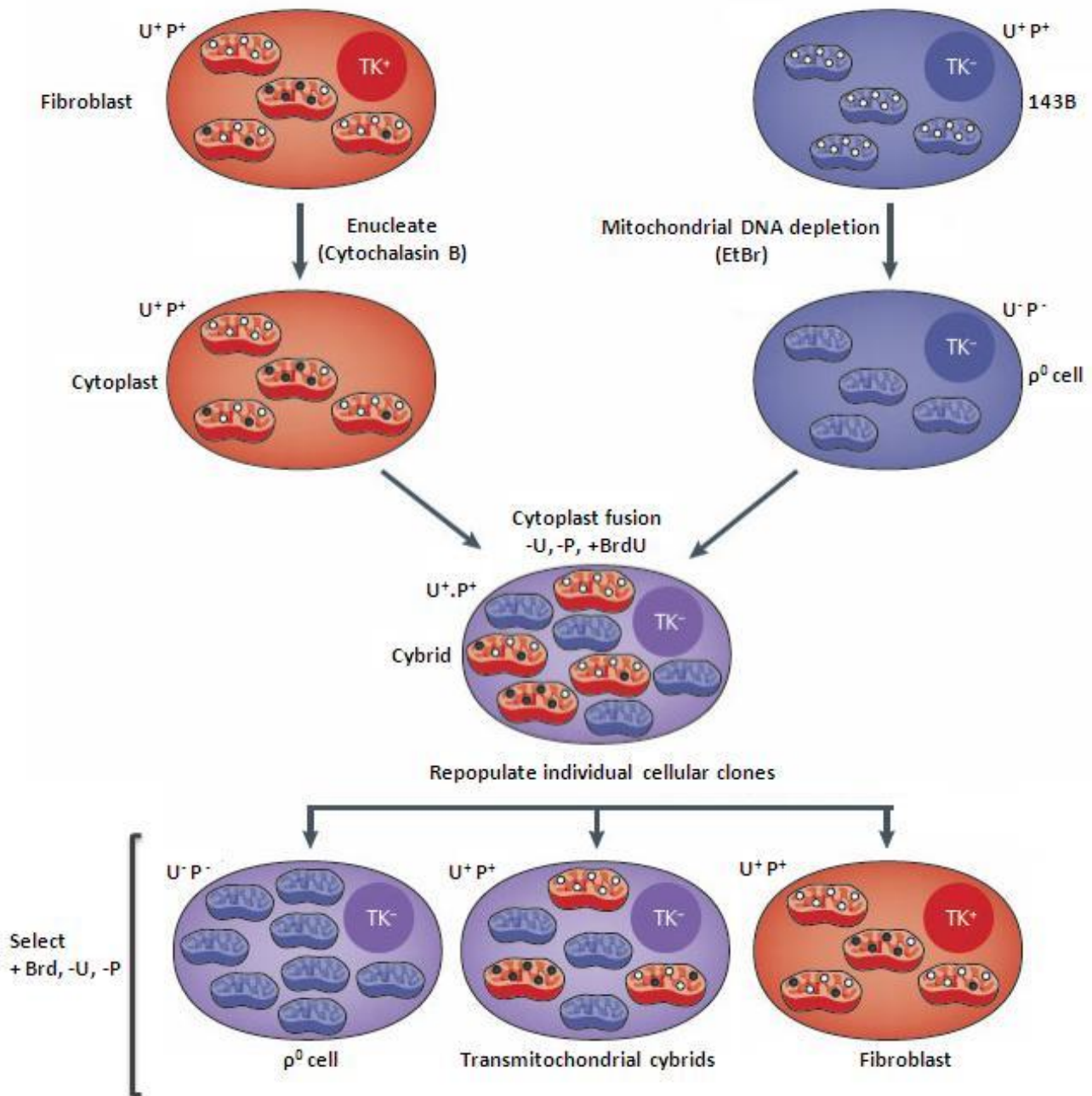


FIGURE 23 : Génération des cellules cybrides

En rouge, le fibroblaste de patient qui contient des mitochondries saines (points blancs) et mutées (points noires) est énuclé grâce à l'exposition à la cytochalasine B. En parallèle, des cellules immortalisées 143B (bleu) sont déplétées de leurs ADNmt grâce à un traitement au bromure d'éthidium. Ces cellules sont ensuite fusionnées avec le cytoplasme provenant de la cellule de patient. La sélection se fait sur un milieu sans uridine ou pyruvate et avec Brdu. D'après (Schon et al., 2012)

6.5. Modèles d'études

Le principal obstacle à l'étude de la pathologie MELAS est l'absence de modèles animaux, en effet à ce jour très peu de modèles sont disponibles et aucun modèle murin ne correspond à cette pathologie.

Les cybrides

A ce jour aucune technologie ne permet l'introduction d'ADN de manière stable et constante au sein d'une mitochondrie chez les mammifères. L'utilisation des cellules cybrides permet aujourd'hui l'étude des maladies mitochondriales telles que le MELAS (King and Attardi, 1989). Ces cellules sont issues de la fusion de deux types cellulaires. D'un côté les cellules de patients porteurs de la mutation, qui après énucléation sont ensuite fusionnées avec des cellules immortalisées préalablement déplétées de leurs mitochondries dites cellules rho0. Ces cellules rho0 sont ensuite fusionnées avec le cytoplasme préalablement énucléé des cellules de patients (contenant donc les mitochondries porteuses de la mutation), on obtient alors un cybride transmitochondrial. Les cybrides sont ensuite sélectionnés sur un milieu sélectif dépourvu d'uridine ou pyruvate avec la sélection de clones porteurs de différents taux d'hétéroplasmie. Les cybrides ainsi obtenus permettent de s'affranchir entièrement du contexte nucléaire puisque qu'elles ont toutes le même fond génétique (nucléaire).

7. Altération du métabolisme des acides aminés dans les pathologies

Comme nous venons de le voir, faute de cibles spécifiques, il n'existe à ce jour aucun traitement efficace permettant de corriger les atteintes de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) retrouvées dans les maladies mitochondriales. En effet la compréhension des altérations du métabolisme retrouvées dans les anomalies OXPHOS reste encore limitée (Chen et al., 2018). Pourtant une adaptation du métabolisme est nécessaire pour compenser les déficits énergétiques dues à ces anomalies OXPHOS (Eales et al., 2016). De plus un déséquilibre des acides aminés (alanine, proline..), notamment ceux qui alimentent le TCA, est retrouvé dans de nombreux déficits mitochondriaux contribuant ainsi à la pathogenèse de la maladie (Smeitink et al., 2006a). Les travaux publiés par *Chen et al.*, ont d'ailleurs récemment montré l'importance du métabolisme oxydatif de la voie glutamine/glutamate/ α -cétoglutarate dans la survie de cellules porteuses de mutations de l'ADNmt. Ils ont également mis en évidence des compensations métaboliques en lien avec la gravité de la pathologie mitochondriale (Chen et al., 2018). La compréhension de ces différences et des possibles compensations métaboliques apparaît donc essentielle pour identifier des nouvelles cibles thérapeutiques. Cette partie va détailler les connaissances physiologiques et pathophysiologiques du glutamate, qui constitue un acide aminé clé de part sa position carrefour dans plusieurs voies métaboliques.

7.1.1. Rôles du glutamate

Le glutamate est un acide aminé non essentiel aux rôles multiples dans le fonctionnement cellulaire et notamment neuronal. Chez les animaux, il est relié au métabolisme du carbone et de l'azote. Suivant les besoins il va servir soit de source d'énergie mitochondriale, soit de réservoir en résidus ammoniac (Erecińska and Silver, 1990). Au niveau du système nerveux, le glutamate tient un rôle majeur dans la neurotransmission, avec un rôle très important dans la plasticité neuronale. Cela confère au glutamate un rôle essentiel dans les fonctions d'apprentissage.

a) **Glutamate un acide aminé neurotransmetteur exciteur**

Le glutamate est impliqué dans de nombreuses fonctions relatives au système nerveux. Il est le principal neurotransmetteur exciteur du cerveau. En 1960, *Curtis et al.* montrent l'action excitatrice du glutamate sur différentes cellules nerveuses (Curtis et al., 1960). Son rôle en tant que neurotransmetteur exciteur a été vraiment défini dans le début des années 80 (Fonnum, 1984).

Le glutamate provient en partie de la conversion de la glutamine via la glutaminase dans le neurone et en partie des conversions se produisant dans le CK. Il est ensuite stocké dans des vésicules sécrétoires sous l'action des transporteurs du glutamate vésiculaire (v-GLUT). La dépolarisation de la membrane présynaptique, entraîne la liaison des vésicules avec la membrane cellulaire provoquant ainsi la libération du glutamate dans la fente synaptique. De part ses propriétés excitotoxique, si le glutamate n'est pas utilisé pour la neurotransmission, il doit être rapidement éliminé de l'espace synaptique afin d'éviter les dommages cellulaires. Le glutamate est alors transporté via des transporteurs d'acides aminés excitateurs (EAAT) situés principalement au niveau des astrocytes. Une fois dans le cytosol des astrocytes ou des oligodendrocytes, le glutamate est converti en glutamine via la glutamine synthétase. Le glutamate utilisé pour la neurotransmission est quant à lui fixé par deux types de récepteurs, les récepteurs ionotropes qui agissent comme des canaux ioniques (NMDA, AMPA et KR) et les récepteurs métabotropes qui utilisent un système intracellulaire de deuxième messenger (mGlu).

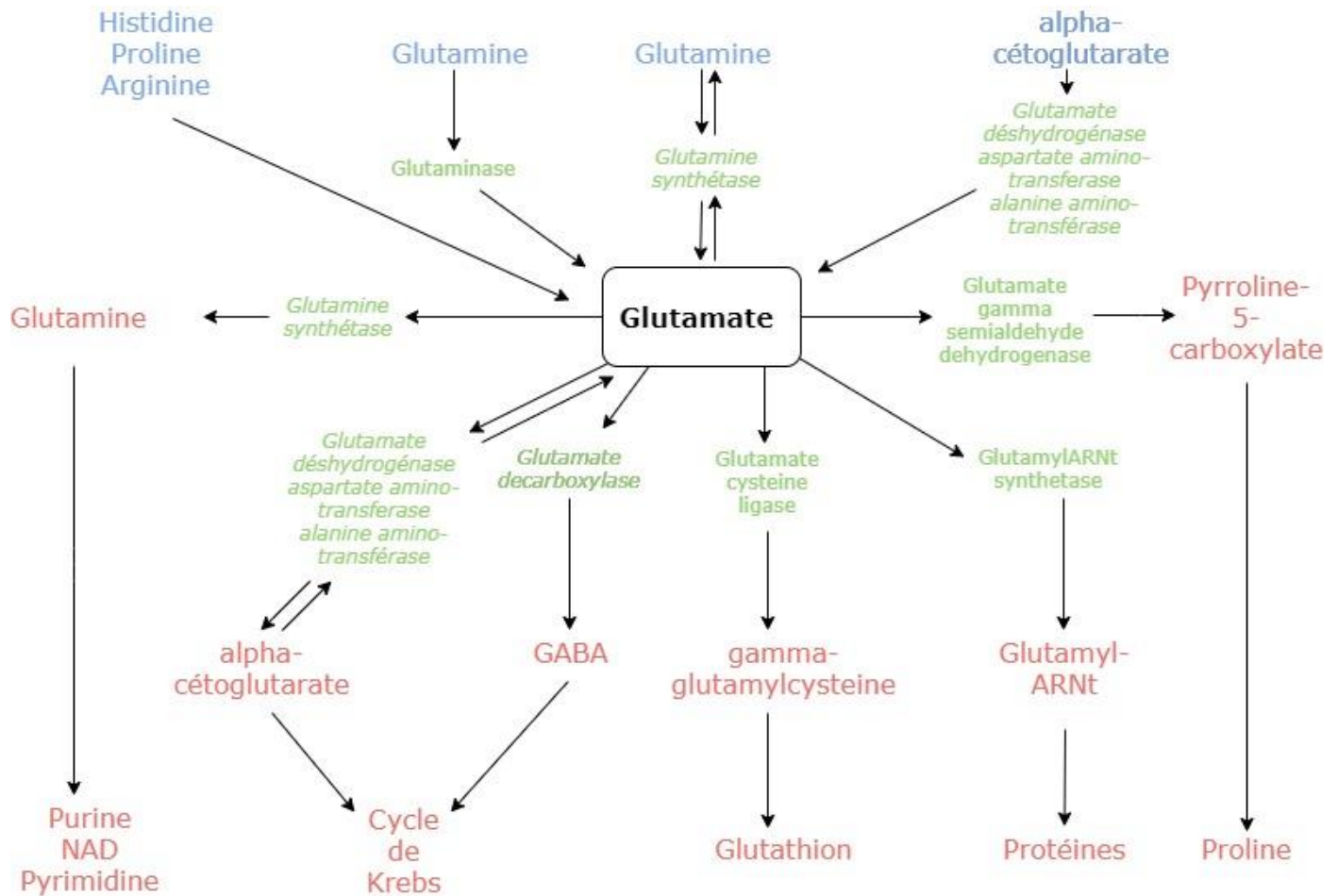


FIGURE 24 : Le glutamate : un métabolite au carrefour des voies métaboliques

En bleu sont représentés les substrats, en vert les enzymes et en rouge les composés produits

b) **Autres rôles du glutamate**

En plus de sa fonction de neurotransmission dans le système nerveux central, le glutamate permet également la production d'un neurotransmetteur inhibiteur l'acide gamma-aminobutyrique (GABA). Cette production se fait par décarboxylation du glutamate par la glutamate décarboxylase (GAD). Cette enzyme existe sous la forme de deux isoformes GAD1 et GAD2 qui varient de part leur poids moléculaire et leur localisation subcellulaire. En effet GAD1 (GAD67) a un poids moléculaire de 67 kDa, une localisation somato-dendritique et est sensible à son cofacteur le pyridoxal phosphate PLP. Alors que GAD2 (gad65) a un poids moléculaire de 65 Kda, une localisation préférentiellement axonale et n'est pas saturée par la PLP. GABA est ensuite libéré au niveau de la fente synaptique où il agit au niveau des neurones post-synaptiques. Sa recapture est effectuée par des neurones ou cellules gliales afin d'assurer son recyclage ou sa dégradation via deux enzymes. GABA est converti en semialdéhyde succinique (SSA) via la GABA transaminase (ABAT). Puis SSA est oxydé en succinate pour rejoindre le CK via la SSA déshydrogénase (SSADH).

7.1.2. Le glutamate est au carrefour des voies métaboliques

Le glutamate peut être formé à partir de plusieurs précurseurs tels que la glutamine, l' α -cétoglutarate, l'histidine, la proline ou l'arginine. Il est également lui-même le précurseur de différents métabolites comme la glutamine, l' α -cétoglutarate ou le GABA (cf : figure 24)

7.1.3. Rôles du Glutamate dans les pathologies

a) Les phénomènes d'excitotoxicité

L'excitotoxicité est un processus entraînant la mort cellulaire médié par des acides aminés excitateurs (AAE).

En 1954 *Hayashi* montre les effets négatifs de l'excès de glutamate, qui cause des crises de convulsions similaires à celles retrouvées dans l'épilepsie et il les met directement en lien avec une action directe sur le système nerveux central chez l'animal. L'équipe de *Lucas et al* montrent par la suite que l'administration parentérale de glutamate chez la souris contrôle ou présentant une dystrophie rétinienne héréditaire entraînent une destruction des neurones de la couche interne de la rétine (*Lucas and Newhouse, 1957*). De nombreuses études réalisées chez différentes espèces et pour différentes structures du système nerveux central ont par la suite confirmé cette toxicité du glutamate (*Olney, 1986; Olney and Ho, 1970; Olney and Sharpe, 1969*). C'est en 1969 que *Olney* nomma pour la première fois ce phénomène de toxicité ou excitotoxicité médié par le glutamate sur différentes régions du cerveau de souris (*Olney and Sharpe, 1969*). Par la suite des expériences prouvant l'induction de la mort cellulaire de différents centres du système nerveux central par différents agonistes endogènes ou exogènes du glutamate ont été publiées (*Coyle et al., 1978, 1978; Nadler et al., 1981; Schwarcz and Coyle, 1977*). Il a été montré que cette excitotoxicité résulte de l'activation excessive des récepteurs ionotropes (*Choi, 1988*). De plus, le rôle du calcium dans ce mécanisme de toxicité a également été établi. (*Choi, 1985; Murphy et al., 1988, 1988*). Enfin les différents mécanismes de mort cellulaire impliquant ces phénomènes d'excitotoxicité telle que la nécrose ou apoptose ont été massivement étudiés. Les fortes concentrations d'acides aminés excitateurs retrouvés dans le cerveau dans certaines pathologies a conduit à l'hypothèse de leur responsabilité dans l'apparition de différentes neuropathies.

Nous traiterons ici essentiellement du rôle du glutamate dans l'épilepsie, bien qu'il soit aussi impliqué dans d'autres pathologies comme les maladies de Huntington, de Parkinson, d'Alzheimer, ou encore la sclérose latérale amyotrophique, les accidents vasculaires et les ischémies.

b) Glutamate et épilepsie

L'épilepsie se définit par un large éventail de conditions neurologiques qui conduisent à des crises convulsives. Le glutamate est impliqué dans la génération de ces crises. En effet chez des patients présentant une épilepsie, la micro-dialyse intra-hippocampique a révélé une augmentation du glutamate juste avant la crise épileptique ainsi qu'une augmentation encore plus drastique pouvant entraîner la mort neuronale lors de la crise. Cette augmentation est encore présente 15 minutes après la crise, ce qui suggère donc une dysfonction de la recapture du glutamate extracellulaire (During and Spencer, 1993). De nombreuses études impliquant les mécanismes médiés par les transporteurs du glutamate ont montré leurs contributions dans l'épilepsie et ont ainsi fourni des preuves de l'implication directe ou indirecte du glutamate dans l'épilepsie.

Les transporteurs du glutamate EAAT représentent le seul mécanisme de recapture du glutamate dans la synapse (Kanai, 1997) et ils permettent donc de prévenir les phénomènes d'excitotoxicités liés. Une diminution de cette recapture peut donc en partie expliquer l'apparition des crises épileptiques. Cinq membres de la famille EAAT ont été à ce jour identifiés, ils ont une structure et donc une fonction très similaire, et diffèrent surtout par leurs distributions. En effet EAAT1 (GLAST), EAAT2 (GLT-1), EAAT3 (EAAC-1) et EAAT4 sont exprimés dans le cerveau, alors que EAAT5 est exprimé dans les photorécepteurs de la rétine. EAAT1 et EAAT2 sont exprimés au niveau astrocytaire, alors que EAAT3 et EAAT4 sont majoritairement exprimés dans les neurones (Lehre et al., 1995; Pow and Barnett, 2000; Rothstein et al., 1994; Yamada et al., 1996). L'utilisation de souris KO pour les transporteurs du glutamate a fourni une preuve directe de son implication dans l'épilepsie. Des souris KO homozygotes pour GLT-1 présentent une perte neuronale ainsi que des crises létales (Tanaka et al., 1997). De la même manière l'inhibition de la synthèse de trois types de récepteurs au glutamate chez le rat (GLAST- GLT-1 et EAAC1) par l'administration d'oligonucléotides anti-sens a conduit à une neurodégénérescence caractéristique de l'excitotoxicité ainsi qu'une paralysie progressive chez les rats GLAST(-) et GLT-1(-). De plus, la perte du récepteur EAAC1 entraîne une neurotoxicité modérée associée à une épilepsie (Rothstein et al., 1996). Le rôle du glutamate dans l'épilepsie peut également être un résultat de son implication indirecte via sa potentialité à former du GABA. Une étude utilisant des anti-sens EAAC1 chez le rat a montré une diminution de 50% des niveaux de GABA hippocampiques ainsi que des crises et des troubles du comportement. (Sepkuty et al., 2002).

D'autres études ciblent les mécanismes médiés par les récepteurs ionotropiques et métabotropiques du glutamate. Nous pouvons par exemple citer la mutation hétérozygote du gène GRIN2A codant pour la sous-unité GluN2A des NMDAR chez des patients souffrant d'épilepsies (Lemke et al., 2013; Yang et al., 2018).

D'autres études ne ciblant pas spécifiquement les tissus neuronaux, ont mis en évidence la part du métabolisme du glutamate et d'autres acides aminés chez les patients épileptiques. Ainsi, une étude s'intéressant aux mécanismes biochimiques et génétiques d'apparition de l'épilepsie a été effectuée à partir de plasma de différents membres d'une famille Japonaise. Cette étude s'intéressait plus précisément à la part du catabolisme du glutamate via sa désamination par la GDH. L'hypothèse était que les taux importants de glutamate observés dans le plasma des patients étaient dus à un défaut fonctionnel de la GDH. Cette hypothèse n'a pas été confirmée car aucune différence au niveau de cette enzyme n'a été observée mais en revanche ils ont constaté des taux très importants de glutamates plasmatiques pour l'ensemble de la cohorte épileptique par rapport aux témoins. Preuve ici d'un défaut du métabolisme du glutamate indépendant de sa fonction en tant que neurotransmetteur (Janjua et al., 1992). Cela a été retrouvé dans une autre étude portant sur des plasmas de patients épileptiques où une augmentation significative du glutamate était associée à une diminution de l'aspartate et de la taurine (van Gelder et al., 1980). Pour conclure de nombreuses pathologies neurologiques, métaboliques ou dégénératives semblent liées à l'action excitotoxique du glutamate. Ces affections n'ayant pour le moment pas de thérapeutiques, il semble donc intéressant d'étudier de manière plus détaillée ce métabolite ainsi que les différentes voies métaboliques dans lequel il est retrouvé.

7.1.4. Corps cétoniques et métabolisme du glutamate/GABA

a) Le régime cétogène

Décrit en premier par *Hippocrate*, le régime cétogène est aujourd'hui largement utilisé. En effet dès le début du 20^{ème} siècle, le jeûne thérapeutique pris en charge dans l'épilepsie a permis la découverte de l'état métabolique de la cétose. Cette découverte a entraîné les scientifiques à créer un régime mimant les effets métaboliques du jeûne. Son utilisation principale concerne les épilepsies pharmaco-résistantes de l'enfant, mais il est également employé dans des troubles du métabolisme, ainsi que dans un certain nombre de troubles neurologiques (Alzheimer, autisme, SLA....)

Le régime cétogène est un régime thérapeutique très strict et rigoureusement calculé. Il repose sur une réduction massive de l'apport glucidique et une augmentation importante de l'apport lipidique, permettant ainsi de créer une cétose. Le foie produit alors des corps cétoniques tels que l'acétone, l'acétoacétate et le β -hydroxypyruvate, substrats alternatifs au glucose (Burger MC ; Desbordes D, 2006).

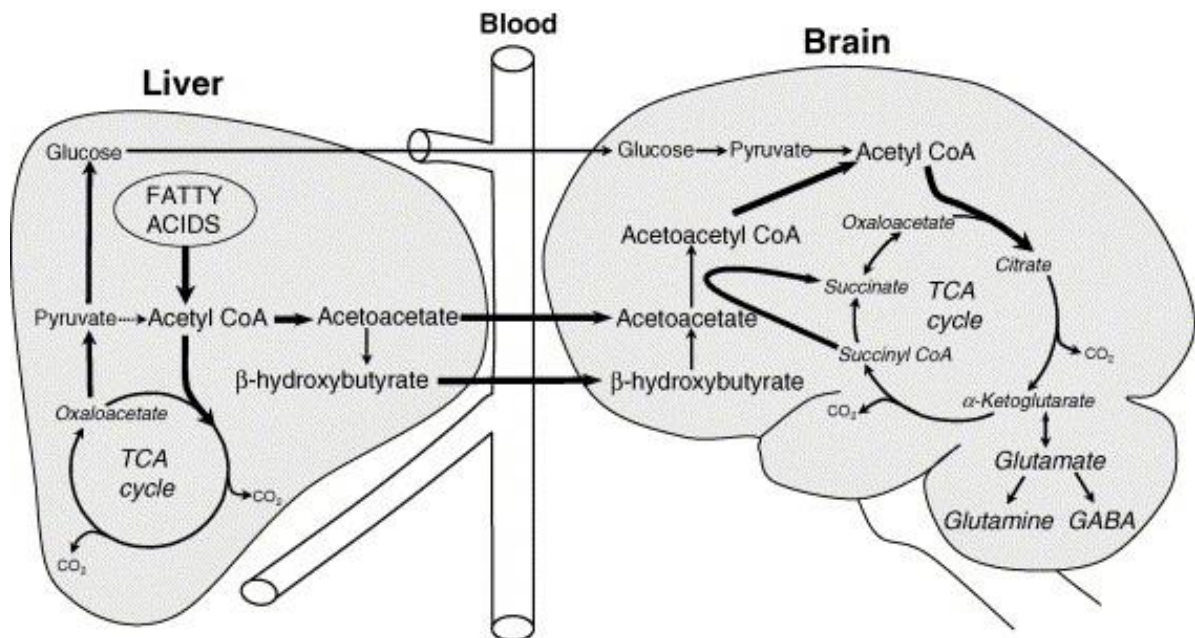


FIGURE 25 : Métabolisme hépatique et cérébral des corps cétoniques.

Lors d'une diminution de la glycémie, les corps cétoniques (acétoacétate et β -hydroxybutyrate) produits par le foie permettent d'alimenter le cerveau. Dans le foie une augmentation nette d'acétyl-CoA est visible suite à l'oxydation importante des acides gras. Très peu d'acétyl-CoA rentre dans le CK du fait que celui-ci est inhibé.

De ce fait l'acétyl-CoA est converti en corps cétoniques qui sont ensuite transportés vers le cerveau. Le β -hydroxybutyrate est transformé en acétoacétate, et l'acétoacétate nécessite une activation en acétoacétyl-CoA avant d'être transformé en Acétyl-CoA et pouvoir entrer dans le CK pour produire de l'énergie. D'après (Melø et

al., 2006)

b) **Formation des corps cétoniques : la cétogénèse et métabolisme neuronal**

Lorsque la glycémie diminue, les acides gras deviennent la principale source d'énergie. L'oxydation de ceux-ci au niveau du foie entraîne la formation d'acétyl-CoA. Le régime cétogène étant pauvre en glucides, le métabolisme hépatique est déplacé vers une production de glucose (via la néoglucogénèse) plutôt que sa dégradation. Par conséquent, l'oxaloacétate et le malate sortent du CK pour subir plusieurs étapes aboutissant à leur conversion en glucose. De ce fait, moins d'oxaloacétate est disponible pour la condensation avec l'acétyl-CoA. Celui-ci s'accumule donc, stimulant ainsi la synthèse des corps cétoniques (acétoacétate et β hydroxybutyrate). L'acétoacétate et le β -hydroxybutyrate sont ensuite transportés dans le sang, ils passent la barrière hémato-encéphalique pour atteindre le cerveau, où ils peuvent diffuser et servir de source d'énergie aux neurones et cellules gliales (cétolyse). Le β -hydroxybutyrate est alors converti en acétoacétate pour permettre la formation en acétyl-CoA qui pourra ainsi être utilisé par le CK. La transformation du β -hydroxybutyrate en acétyl-CoA fournit du succinate qui va être oxydé par le complexe II et constituerait donc une hypothèse de substrat directement accessible dans le cas de déficit du complexe I (Rahman, 2012; Steriade et al., 2014).

c) **Exemple de l'application du régime cétogène dans certaines pathologies**

Le régime cétogène est donc principalement utilisé dans les épilepsies pharmaco-résistantes où de nombreuses études ont pu confirmer son efficacité. Le régime cétogène est également employé lors de déficit des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale mais aussi lors de déficits de la pyruvate déshydrogénase ou des transporteurs intracérébraux du glucose (Burger MC ; Desbordes D, 2006).

Syndrome de déficit en transporteur du glucose intracérébral (GLUT1) ou maladie De Vivo

Ce syndrome est une maladie métabolique responsable d'une encéphalopathie épileptique pharmaco-résistante traitable par le régime cétogène. Le transporteur GLUT-1 permet le passage du glucose à travers la barrière hématoencéphalique. L'équipe de *De Vivo* est à l'origine de la découverte de cette maladie. L'étude de deux enfants qui présentaient des concentrations faibles en glucose dans le LCR, des convulsions et un retard de développement. Ces deux enfants ont été traités par le régime cétogène avec une nette amélioration clinique (De Vivo et al., 1991).

Maladies mitochondriales

Déficit en pyruvate déshydrogénase

Le pyruvate formé lors de la glycolyse dans le cytosol est transporté dans la mitochondrie où il subit une décarboxylation oxydative pour former de l'acétyl-CoA. Cette décarboxylation nécessite un complexe multi-enzymatique, la pyruvate déshydrogénase (PDH). Les patients avec un déficit au niveau de la PDH présentent une acidose lactique, un CK perturbé ainsi qu'un défaut au niveau de la production énergétique. La voie d'utilisation du glucose étant perturbée, le régime cétogène apparait comme un traitement alternatif pour pallier au déficit de la PDH (Falk et al., 1976). Une étude récente sur 19 patients pédiatriques traités sur une durée moyenne de 2,9 ans par un régime cétogène a montré un effet positif du traitement dans les domaines de l'épilepsie, de l'ataxie, du trouble du sommeil, du développement de la parole et du langage, de la vie social, et une diminution des hospitalisations (Sofou et al., 2017).

Maladie mitochondriale et épilepsie

Bien que la prévalence exacte de l'épilepsie mitochondriale ne soit pas connue, 35 à 60% des patients atteints par une maladie mitochondriale souffrent de crises d'épilepsies (Rahman, 2012). Dans l'étude de 199 enfants présentant une épilepsie dont 13 présentent également des troubles mitochondriaux telles qu'un déficit en PDH ou un déficit en complexes de la chaîne respiratoire, la mise en place d'un régime cétogène a montré des effets positifs (Kang et al., 2005). L'étude de *Kang et al.* portant sur 14 enfants présentant une épilepsie pharmacorésistante associée à des anomalies des complexes de la chaîne respiratoire et traités 18 mois par un régime cétogène a également montré des effets favorables avec une réduction des crises pour 10 patients, un arrêt du traitement antiépileptique pour 8 d'entre eux et une amélioration générale des fonctions cognitives et comportementales (Kang et al., 2007).

d) **Implication des corps cétoniques sur le métabolisme du glutamate et GABA**

Dans les années 1930, la première démonstration anti-épileptique des corps cétoniques est établie. Il a alors été montré que l'acétoacétate et l'acétone protègent des crises induites par le thuyone (principe actif de la plante d'absinthe) chez le lapin (Keith, 1933; Keith and Stavray, 1935). Par la suite de nombreuses études ont montré les effets anti-épileptiques de l'acétone et de l'acétoacétate, mais pas du β -hydroxybutyrate. Ce n'est que dans les années 2000, que l'effet protecteur du β -hydroxybutyrate est proposé. En effet plusieurs études montrent un rôle anti-épileptique de celui-ci, mais de manière non immédiate, il faut en effet plusieurs administrations de β -hydroxybutyrate pour en constater les effets bénéfiques (Kim et al., 2015; Yum et al., 2015).

Il est aujourd'hui proposé que les corps cétoniques entraînent une altération du métabolisme des acides aminés en augmentant la synthèse des neurotransmetteurs inhibiteurs GABA et en diminuant la concentration ou en augmentant le flux du glutamate du neurotransmetteur exciteur (Erecińska et al., 1996; Yudkoff et al., 1997, 2001). Ceci est possible car le cerveau peut convertir les corps cétoniques en acétyl-CoA (DeVivo et al., 1978; Gjedde and Crone, 1975) en condensant l'oxaloacétate pour être incorporé dans le TCA. L'utilisation de l'oxaloacétate diminue donc les réactions de transamination du glutamate en aspartate et α -cétoglutarate, qui est la voie majeure de dégradation du glutamate dans le cerveau (Mason et al., 1995; Yudkoff et al., 1994). Par conséquent, une plus grande quantité de glutamate est disponible pour la réaction de décarboxylation conduisant à la formation de GABA, ce qui peut contribuer à un effet anti-épileptique (Yudkoff et al., 2008).

Dans une expérience sur des souris allaitantes, l'administration de β -hydroxybutyrate induit des modifications métaboliques. En effet une baisse de la glycolyse cérébrale a été retrouvée relative à une diminution de l'utilisation de glucose en parallèle à cet effet, une augmentation du flux métabolique du CK été également observée. Il a également été retrouvé une réduction de la concentration cérébrale d'aspartate, renforçant l'hypothèse de la diminution de la transamination du glutamate en aspartate (Thurston et al., 1986). Dans une étude plus récente qui s'intéresse au métabolisme des acides aminés dans le cerveau en réponse à l'administration d'acétate chez la souris, les auteurs ont retrouvé une diminution de la concentration d'aspartate associée à une augmentation d'acétyl-CoA dans le cerveau antérieur. Ils ont également retrouvé une concentration importante de GABA et de glutamine après une administration d'acétate. Ces données ont soutenu l'hypothèse que lors de l'utilisation des corps cétoniques ceux-ci étant convertit en acétyl-CoA, le flux de réaction de la citrate synthase augmente et provoque ainsi une diminution de l'accessibilité de l'OA à la réaction de transamination du glutamate en aspartate, d'où une diminution de celui-ci. Le glutamate devient alors accessible à la réaction de décarboxylation produisant alors du GABA (Yudkoff et al., 2005).

Le glutamate étant comme l'aspartate un neurotransmetteur exciteur du cerveau, sa diminution devrait théoriquement contribuer à l'activité anticonvulsive des corps cétoniques. Dans une expérience de traitement aux corps cétoniques de 21 jours, l'analyse des cortex cérébraux a révélé une diminution du glutamate chez les rats traités par rapport aux individus témoins (Melø et al., 2006). Cependant la majorité des études n'ont pas observé de diminution des niveaux de glutamate, mais ont mis en évidence une augmentation du flux métabolique de celui-ci sous régime cétogène (Bough et al., 2006; Yudkoff et al., 2005). Une étude réalisée sur des acides aminés présente dans le LCR de jeunes enfants renforce l'hypothèse que le régime cétogène entraînerait des altérations du métabolisme des acides aminés exciteurs. En effet, dans cette étude, ils ont observé une tendance à la baisse du glutamate et de l'aspartate dans les sujets répondeurs ou non, traités au régime cétogène, ainsi qu'une augmentation de GABA. En comparant ces concentrations par groupe d'âge, ils ont pu montrer une diminution significative de la quantité glutamate et une augmentation de GABA chez les sujets les plus jeunes (≥ 5.5 ans). (Dahlin et al., 2005).

Problématique

Parmi les différentes pathologies mitochondriales étudiées au sein du laboratoire Mitolab, mon travail de thèse s'est concentré sur le syndrome MELAS et plus particulièrement sur la mutation majoritairement retrouvée pour ce syndrome à savoir la mutation hétéroplasmique m.3243A>G. Comme mentionné précédemment, cette maladie mitochondriale est très invalidante, d'évolution fatale avec à ce jour aucun traitement curatif. Mon travail s'est organisé en deux parties :

Mieux appréhender la physiopathologie du syndrome MELAS

La première partie de mon travail visait à mieux comprendre la physiopathologie du syndrome MELAS et notamment le déficit, le rôle et l'importance du défaut d'assemblage du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale entraînant un défaut oxydatif des cellules portant la mutation m.3243A>G.

Développer des stratégies thérapeutiques visant à améliorer le tableau clinique de la maladie

La seconde partie mon travail visait à étudier l'intérêt des outils de « multi-omiques » afin de renforcer la compréhension de la physiopathologie du syndrome MELAS et d'identifier les différentes voies métaboliques impactées dans nos modèles cellulaires mutants. Nous nous sommes également penchés sur la possibilité d'utiliser des stratégies métaboliques comme traitement du syndrome MELAS en étudiant l'impact d'un régime cétoène ainsi que d'une restriction glucidique sur nos modèles cellulaires reproduisant la pathologie MELAS.

Résultats

1. Amélioration du métabolisme oxydatif, ainsi que l'assemblage et activité du complexe I dans les cybrides MELAS suite à un traitement avec les corps cétoniques

1.1. Introduction

De nombreuses études ont rapporté une dysfonction mitochondriale ainsi qu'un défaut sévère des activités des complexe I et IV de la chaîne mitochondriale chez des patients MELAS (Hirano and Pavlakis, 1994). Néanmoins la plupart de ces études ont été réalisées sur des fibroblastes, des tissus musculaires de patients MELAS ou sur des cellules cybrides 143B provenant d'ostéosarcome. Très peu d'études se sont vraiment intéressées aux organes les plus touchés, comme par exemple le cerveau.

Le laboratoire a donc développé des cybrides transmitochondriaux de type neuronal et porteurs de la mutation m.3243A>G avec différents taux d'hétéroplasmies, issus d'une lignée neuroblastome parentale SH-SY-5Y (Desquiret-Dumas et al., 2012). Lors d'une précédente étude menée au laboratoire (Desquiret-Dumas et al., 2012), il a été montré que ces différents cybrides porteurs de la mutation MELAS modifiaient le métabolisme énergétique cellulaire en favorisant la glycolyse au dépend de la phosphorylation oxydative mitochondriale. L'assemblage ainsi que la fonction de la chaîne respiratoire mitochondriale et en particulier du complexe I sont significativement altérés dans ces cybrides MELAS. Lors de cette étude, il a été montré une diminution du niveau d'hétéroplasmie pour les cellules porteuses de la mutation m.3243A>G dans des conditions métaboliques modifiées suite à une réduction de la concentration en glucose dans le milieu de culture (0.5g/L). Les cellules MELAS en apparence homoplasmique pour la mutation m.3243A>G, se retrouvent avec un taux de mutation de 90% après 4 semaines de culture dans un milieu réduit en glucose. Il a également été mis en avant l'importance du traitement en L-arginine dans la réduction de la dysfonction mitochondriale et la physiopathologie du MELAS. De même, les activités enzymatiques des cellules MELAS cultivées en présence de L-arginine étaient significativement améliorées tout comme l'assemblage et la formation des supercomplexes.

Cette étude a donc mis en avant l'intérêt d'un traitement par L-arginine comme cela était déjà démontré sur le plan clinique avec une réduction significative des épisodes d'accidents vasculaires chez les patients atteints du syndrome MELAS (Koga et al, 2006). Cependant malgré les effets positifs observés de cette supplémentation en L-arginine, son mécanisme d'action reste encore mal compris et l'utilisation de modèles cellulaires endothéliaux MELAS pourraient permettre de mieux comprendre les différents mécanismes physiopathologiques impliqués. Notre laboratoire s'est également intéressé à l'utilisation de stratégies métaboliques comme le régime cétogène pour moduler cette dysfonction mitochondriale identifiée pour le syndrome MELAS et de pouvoir analyser les mécanismes thérapeutiques potentiels.

Le régime cétogène est utilisé depuis des décennies dans les crises d'épilepsies, aujourd'hui il est communément utilisé et reconnu dans le traitement des épilepsies pharmaco-résistantes (Barborka, 1928; Kverneland et al., 2015; Liu et al., 2018, 2018; M et al., 2015; Neal et al., 2008). Depuis une vingtaine d'années de nombreuses études ont été menées sur l'intérêt de cette stratégie métabolique pour les maladies mitochondriales associées à des épilepsies et notamment dans les déficits du complexe I (El Sabbagh et al., 2010; Kang et al., 2007; Lee et al., 2008; Martikainen et al., 2012). De manière intéressante l'utilisation *in vitro* des corps cétoniques pendant 5 jours pour des lignées cybrides de patients présentant le syndrome de Kearns-Sayre associé à des délétions hétéroplasmiques de l'ADNmt, permet de réduire le niveau d'hétéroplasmie et conduit à une amélioration de la fonction mitochondriale (Santra et al., 2004).

Cependant sur le plan clinique très peu d'études concernant l'impact du régime cétogène sur le syndrome MELAS n'ont été rapportées. L'étude d'une patiente MELAS m.3260A>G de 22 ans ayant présenté une acidose lactique et des épisodes de type AVC traitée par régime cétogène montre une diminution du nombre d'accidents vasculaires avec une amélioration de la symptomatologie clinique (Steriade et al., 2014).

Devant l'intérêt de ces stratégies métaboliques, l'équipe Mitolab s'est intéressée depuis plusieurs années à l'utilisation des corps cétoniques comme traitement potentiel du syndrome MELAS. Un remplacement des substrats énergétiques glucidiques par des corps cétoniques pour des périodes allant de 14 ou 28 jours a donc été réalisé pour des lignées cybrides sauvages et mutantes avec un taux d'hétéroplasmie de 98% pour la m.3243A>G.

1.2. Article

Biochimica et Biophysica Acta 1863 (2017) 284–291



Contents lists available at ScienceDirect

Biochimica et Biophysica Acta

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



The addition of ketone bodies alleviates mitochondrial dysfunction by restoring complex I assembly in a MELAS cellular model



Samuel Frey ^a, Guillaume Geffroy ^a, Valerie Desquiret-Dumas ^{a,b}, Naig Gueguen ^{a,b}, Celine Bris ^{a,b}, Sophie Belal ^a, Patrizia Amati-Bonneau ^{a,b}, Arnaud Chevrollier ^a, Magalie Barth ^b, Daniel Henrion ^a, Guy Lenaers ^a, Dominique Bonneau ^{a,b}, Pascal Reynier ^{a,b}, Vincent Procaccio ^{a,b,*}

^a UMR CNRS 6214-INSERM U1083, Mitovasc Institute, Angers University, Angers, France

^b Biochemistry and Genetics Department, Angers Hospital, F-49000, France



The addition of ketone bodies alleviates mitochondrial dysfunction by restoring complex I assembly in a MELAS cellular model



Samuel Frey^a, Guillaume Geffroy^a, Valerie Desquiret-Dumas^{a,b}, Naig Gueguen^{a,b}, Celine Bris^{a,b}, Sophie Belal^a, Patrizia Amati-Bonneau^{a,b}, Arnaud Chevrollier^a, Magalie Barth^b, Daniel Henrion^a, Guy Lenaers^a, Dominique Bonneau^{a,b}, Pascal Reynier^{a,b}, Vincent Procaccio^{a,b,*}

^a UMR CNRS 6214-INSERM U1083, Mitovasc Institute, Angers University, Angers, France

^b Biochemistry and Genetics Department, Angers Hospital, F-49000, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 June 2016

Received in revised form 24 October 2016

Accepted 29 October 2016

Available online 1 November 2016

Keywords:

Mitochondria
Mitochondrial diseases
Mitochondrial DNA
MELAS syndrome
Complex I assembly
Ketone bodies

ABSTRACT

Ketogenic Diet used to treat refractory epilepsy for almost a century may represent a treatment option for mitochondrial disorders for which effective treatments are still lacking. Mitochondrial complex I deficiencies are involved in a broad spectrum of inherited diseases including Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes syndrome leading to recurrent cerebral insults resembling strokes and associated with a severe complex I deficiency caused by mitochondrial DNA (mtDNA) mutations.

The analysis of MELAS neuronal cybrid cells carrying the almost homoplasmic m.3243A>G mutation revealed a metabolic switch towards glycolysis with the production of lactic acid, severe defects in respiratory chain activity and complex I disassembly with an accumulation of assembly intermediates. Metabolites, NADH/NAD⁺ ratio, mitochondrial enzyme activities, oxygen consumption and BN-PAGE analysis were evaluated in mutant compared to control cells. A severe complex I enzymatic deficiency was identified associated with a major complex I disassembly with an accumulation of assembly intermediates of 400 kDa. We showed that Ketone Bodies (KB) exposure for 4 weeks associated with glucose deprivation significantly restored complex I stability and activity, increased ATP synthesis and reduced the NADH/NAD⁺ ratio, a key component of mitochondrial metabolism. In addition, without changing the mutant load, mtDNA copy number was significantly increased with KB, indicating that the absolute amount of wild type mtDNA copy number was higher in treated mutant cells. Therefore KB may constitute an alternative and promising therapy for MELAS syndrome, and could be beneficial for other mitochondrial diseases caused by complex I deficiency.

© 2016 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mitochondria are responsible for the production of ATP through oxidative phosphorylation (OXPHOS) required for cellular functions. Mitochondrial diseases may result from mutations in either the nuclear genome or the mitochondrial DNA (mtDNA). Mitochondrial Encephalomyopathy, Lactic Acidosis and Strokes like episodes (MELAS) syndrome is characterized by a triad of symptoms, which are encephalopathy, stroke like episodes before the age of 40 and lactic acidosis [1]. Other clinical features include at various degrees other neurological symptoms, exercise intolerance, cardiomyopathy, deafness and diabetes.

Abbreviations: CI, Complex I; OXPHOS, oxidative phosphorylation; mtDNA, mitochondrial DNA; ND, NADH dehydrogenase; NADH, Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrate; NAD⁺, Nicotinamide Adenine Dinucleotide; ROS, Reactive Oxygen Species; kDa, Kilo Dalton; BN-PAGE, Blue Native PAGE; HG, High glucose; KB, ketone bodies; TCA, tricarboxylic acid cycle.

* Corresponding author at: Biochemistry and Genetics Laboratory, Angers University Hospital, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France.

E-mail address: VProcaccio@chu-angers.fr (V. Procaccio).

About 80% of MELAS syndromes are caused by the m.3243A>G mutation in the mtDNA resulting in a substitution in the tRNA^{Leu(UUR)} gene [2]. Furthermore, the severity of the disease is determined by the heteroplasmic rate which is the ratio of mutant to normal mtDNA [3].

MELAS syndrome is also associated with lactic acidosis and commonly associated with multiple partial respiratory chain defects, especially involving complex I and/or complex IV deficiencies [1]. Complex I defect appears as a prevalent feature in MELAS syndrome [4]. Moreover, a close relationship appears to exist between MELAS and complex I deficiency as reported into the literature [4–6]. In addition, complex I deficiency is present in up to 30% of mitochondrial diseases [7] and in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease, for which effective curative therapies are still lacking [8].

Therapies for mitochondrial diseases are still limited because of the rarity and the clinical heterogeneity of these diseases. The so called “mitochondrial cocktails” including carnitine, antioxidants or coenzyme Q10 are commonly used in mitochondrial disorders, including MELAS, but consensus for its use and efficacy is missing [8]. L-arginine or even citrulline has been proposed as a treatment for stroke-like episodes of

MELAS owing to the fact that vascular endothelial cell vasodilator NO is reduced in this disease [9,10]. However, the discrepancy between the generalized energetic defect observed in MELAS and the specific neurovascular clinical expression remains largely unexplained [11]. Several other pathophysiological mechanisms including impaired mitochondrial energy production or microvasculature angiopathy are involved in MELAS and may require additional therapeutic strategies.

The ketogenic diet composed of a high fat and low carbohydrate regimen, has been used since the last century to treat refractory epilepsy and is usually based on lipid:nonlipid ratios of either 3:1 or 4:1 (for review see [12]). Very recently, a Cochrane study on ketogenic diet used for intractable epilepsies judged only seven randomized controlled clinical trials on pediatric patients to be methodologically valid. All randomized trials showed promising results supporting the use of ketogenic diet in epilepsy [13]. The regimen has also shown beneficial effects in patients with mitochondrial respiratory chain defects [14], or Leigh syndrome [15]. The idea beyond this treatment is to substitute another energetic substrate than glucose to the mutant cells. Basically, the fatty acids are used in the liver to produce ketone bodies, mainly acetoacetate and β -D-hydroxybutyrate, which are able to pass the blood brain barrier and switch from glycolysis to the use of ketone bodies (KB) fuelling directly mitochondria. It was further hypothesized that KB used as substrates for complex II, increase the oxidative metabolism bypassing complex I [16,17].

To investigate the metabolic mechanisms of KB in MELAS syndrome, a transmitochondrial mutant cybrid model shown to be associated with a severe complex I deficiency was treated over a period of 4 weeks demonstrating a significant improvement of complex I assembly and activity.

2. Material and methods

2.1. Cell culture

The SH-SY5Y parental cells and mutant cybrid cells carrying the m.3243A>G with 98.6% mutant load were cultured in standard DMEM high glucose media (4.5 g/L) or in low glucose (0.5 g/L) (PAN biotech), supplemented with 10% fetal bovine serum, 1% glutamine and 50 μ g/mL uridine (Sigma) at 37 °C in presence of 5% CO₂ as described elsewhere [18]. The medium was changed every 3 days for 4 weeks. The doses of KB doses were chosen in agreement with concentrations previously used in *in vitro* studies [19]. The durations of the KB exposure and time course and cell collection were selected based on our previous study [18]. For the KB treatment, 5 mM of acetoacetate and β -D-hydroxybutyrate (Sigma Aldrich, Lyon, France) were added to the low glucose media, and cells collected after 14 or 28 days for further analysis.

2.2. Quantification of mtDNA heteroplasmy and mtDNA copy number

The quantification of the mutant load was performed as described [18]. To determine the mtDNA copy number in cells, quantitative PCR (Q-PCR) was performed by SYBR Green incorporation using the Chromo4 System (Biorad) in a 20 μ L reaction volume containing a final concentration of 0.5 mM of each gene-specific primer. The pairs of selected primers were, respectively, ND4 (Forward: actctcactgccaagaact and Reverse: ggtgaggcgtattatacca) and COX1 (Forward: tacgtttagccactccact and Reverse: agtaactcggggcattccg) to quantify the mtDNA copy number, and B2 microglobulin (Forward: cagcattctgcccagcc and Reverse: caatgttctccacatagtgggg) to quantify the nuclear DNA in mutant and control SHSY-5Y cells. The reactions were performed as follows: initial denaturing at 95 °C for 10 min, and 35 cycles at 95 °C for 30 s, 60 °C for 1 min. A melting curve was analyzed in order to check the specificity of the PCR products.

2.3. Metabolites and NADH/NAD⁺ measurements

Glucose, pyruvate and lactate concentrations were measured by spectrophotometry with a Xenius apparatus (SAFAS, Monaco) according to the manufacturer (Abcam, Paris France). Acetoacetate concentration was determined by measuring the NADH oxidation at pH 7 by the β -hydroxybutyrate dehydrogenase enzyme (Roche Applied Science, Penzberg Germany). β -D-hydroxybutyrate concentration was determined by measuring the NADH reduction by the β -hydroxybutyrate dehydrogenase enzyme. The cytosolic NAD(H)-redox state was determined using the metabolite indicator method, based on the lactate dehydrogenase reaction, by measuring pyruvate to lactate ratio in cell culture media.

2.4. Mitochondrial enzymatic activities and oxygen consumption measurements

Activities of OXPHOS complexes and citrate synthase were measured at 37 °C on an UVmc2 spectrophotometer (SAFAS, Monaco) as described [18]. The O₂ consumption was measured using an Oroboros oxygraph (Oroboros, Austria) on both intact cells according to [20] and permeabilized cells, using digitonin [21].

2.5. Blue-native-PAGE of respiratory chain complexes

Mitochondria were extracted using digitonin and complex assembly was revealed using antibodies against the NDUFS2 complex I subunit and the 70 kDa complex II subunit as a loading control (Abcam, Paris, France), and visualized using an enhanced chemiluminescence kit (Pierce, Waltham, USA) on a Li-cor ODYSSEY-Fc apparatus (Li-Cor Biosciences Biotechnology, Lincoln, USA) [18].

2.6. Statistical analysis

Differences between groups were evaluated by the Mann-Witney statistical test for independent samples and by the Wilcoxon signed rank test for related samples. The asterisk (*, ** and ***) indicates significant differences (respectively $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.005$).

3. Results

3.1. MELAS oxidative metabolism is impaired due to a severe complex I deficiency

The routine respiration i.e. the spontaneous mitochondrial O₂ cell consumption of the MELAS cybrid cells was significantly decreased by 39% compared to the parental cells (Fig. 1A). The routine phosphorylating respiration dedicated to ATP production (difference between the routine and the respiration in the presence of oligomycin) was also reduced by >50% in mutant cells compared to parental cells (Fig. 1B). Moreover, the maximal respiration of the mutant cells (i.e. the respiration in the presence of FCCP, an uncoupler) was also reduced by >50%, compared to parental cells (Fig. 1C), suggesting that the MELAS mutation impairs the respiratory chain routine and maximal capacity.

In addition, a severe complex I enzymatic activity deficiency with about 56% reduction was found in mutant cells compared to parental cells, while complex II and IV activities were not-significantly modified (Fig. 1D). Moreover, complex I assembly was severely impacted by the MELAS mutation, with the presence of 400 kDa assembly intermediates (Fig. 1E).

The metabolic consequences of the complex I deficiency were also evaluated in the culture medium of mutant cells compared to parental cells. Glucose consumption was significantly increased in mutant cells, and associated with a twofold increase of lactate production, leading to a reduction of pyruvate accumulation (Fig. 1F), suggesting a metabolism highly reliant on the glycolytic pathway, and confirmed with a

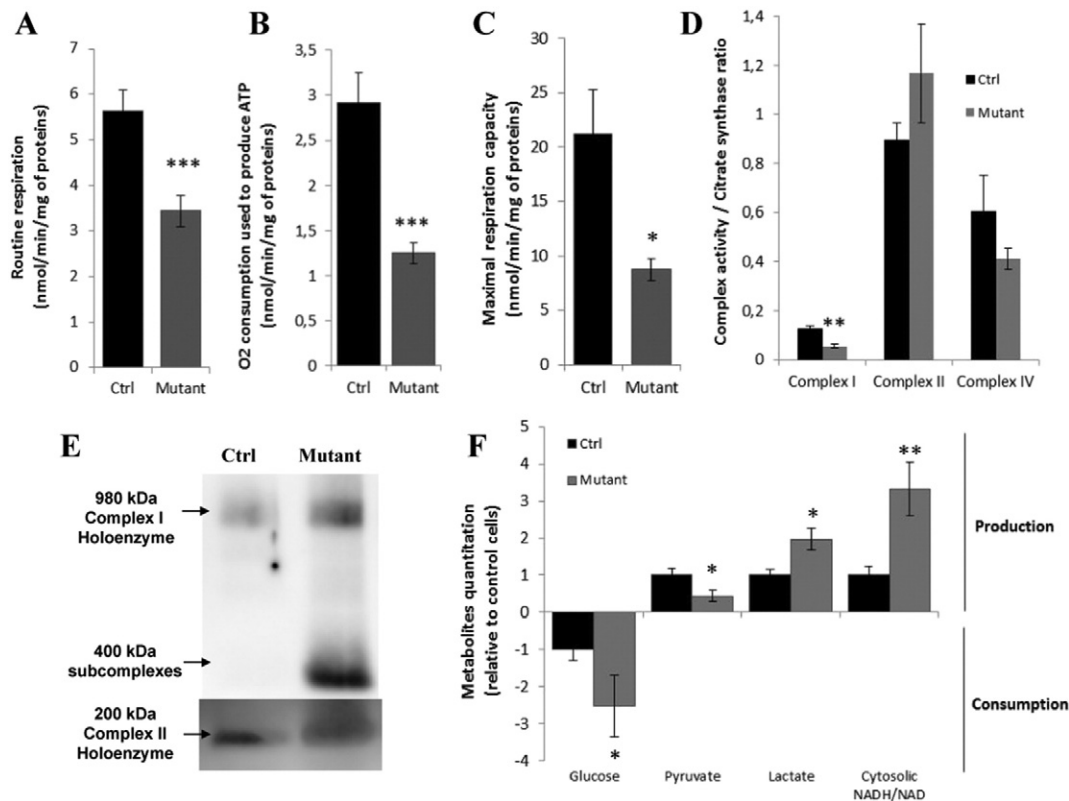


Fig. 1. Comparison of mutant cybrid cells with parental control cells. (A) Oxygenographic measurements of mitochondrial routine respiration of control (ctrl) (black bars) and mutant cells (gray bars), $n \geq 4$. (B) Oxygenographic measurements of the routine respiration used to produce ATP in control (black bars) and mutant cells (gray bars), $n \geq 4$. (C) Oxygenographic measurements of the maximal respiration in control (black bars) and mutant cells (gray bars), $n \geq 4$. (D) Complex I, II and IV/citrate synthase ratio of parental or control (ctrl) (black bars) and mutant cells (gray bars), $n \geq 4$. (E) Blue-Native PAGE analysis of the complex I assembly in mutated and control cells. Complex I holoenzyme and assembly intermediates were visualized by enhanced chemiluminescence after primary antibody incubation (NDUFS2). Complex II holoenzyme is used as loading control. (F) Glucose consumption, pyruvate and lactate production and cytosolic NADH/NAD ratio of control (black bars) and mutant cells (gray bars), $n \geq 10$. The data are presented as mean \pm sem of the different experiments.

higher cytosolic NADH/NAD ratio in mutant cells (Fig. 1F), indicator of the transformation of pyruvate into lactate.

3.2. Ketone bodies improve the mitochondrial respiration in mutant cells

Mutant cells were cultured in the presence of 5 mM of KB combined with a significant reduction of the glucose concentration to 0.5 g/L in the medium, compared to the regular high glucose (HG) medium (4.5 g/L). The KB doses were chosen in agreement with the concentrations seen in blood of patients under ketogenic diet [22] and with concentrations previously used in *in vitro* studies [19].

Nevertheless, after 4 weeks of treatment, the routine respiration was significantly increased by >2-fold in KB MELAS treated cells compared to untreated cells (Fig. 2A). Furthermore, the part of the routine respiration used to produce ATP was significantly increased by 76% under KB (Fig. 2B), and similarly the maximal respiration was increased by more than twofold (Fig. 2C). These results indicate that after 28 days, the KB treatment improved mitochondrial routine and maximal O₂ consumption of mutant cells.

3.3. Ketone bodies increase pyruvate metabolism and reduce the cytosolic NADH/NAD ratio in mutant cells

After 14 days of treatment, the glucose consumption, pyruvate and lactate production were not significantly changed compared to standard conditions (data not shown). However after 28 days of KB we found that the pyruvate consumption was significantly enhanced in mutant cells without increasing lactate level (Fig. 2D), and without modifying the glucose consumption/lactate production ratio (Fig. 2E),

indicating that pyruvate was massively used by mitochondria. Moreover, these changes were associated with a significant reduction of the cytosolic NADH/NAD⁺ (Fig. 2D). Taken together, these results suggest a restoration of the mitochondrial metabolism after 28 days of KB.

3.4. Ketone bodies reduce the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio in mutant cells

Within the mitochondrial compartment, the NADH is re-oxidized by the respiratory chain complex I into NAD⁺. The mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio appears as a key component of mitochondrial metabolism. In order to understand the role of the NADH/NAD⁺ ratio in the restoration of the mitochondrial metabolism under KB, NAD⁺ was added to permeabilized mutant cells during oxygenographic measurements to stimulate the NADH formation through the Tri Carboxylic Acid (TCA) cycle. The O₂ consumption was first measured in standard High Glucose (HG) (Fig. 3A1). The addition of NAD⁺ had no effect on complex I mediated respiration but inhibited complex II and TCA cycle mediated respiration rates by 44% and 40% respectively compared to cells without NAD⁺ addition. These results suggest an accumulation of NADH through the TCA cycle which retro-inhibits the TCA cycle linked respiration, i.e. TCA and complex II mediated respiration rates. However, after 28 days of KB, the complex I mediated respiration was significantly increased by >2-fold in response to the NAD⁺ addition, without inhibiting complex II and TCA cycle mediated respiration, suggesting the reoxidation of NADH through complex I (Fig. 3A2).

To confirm our hypothesis, the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio was measured after 14 and 28 days of KB, revealing a 50% reduction at

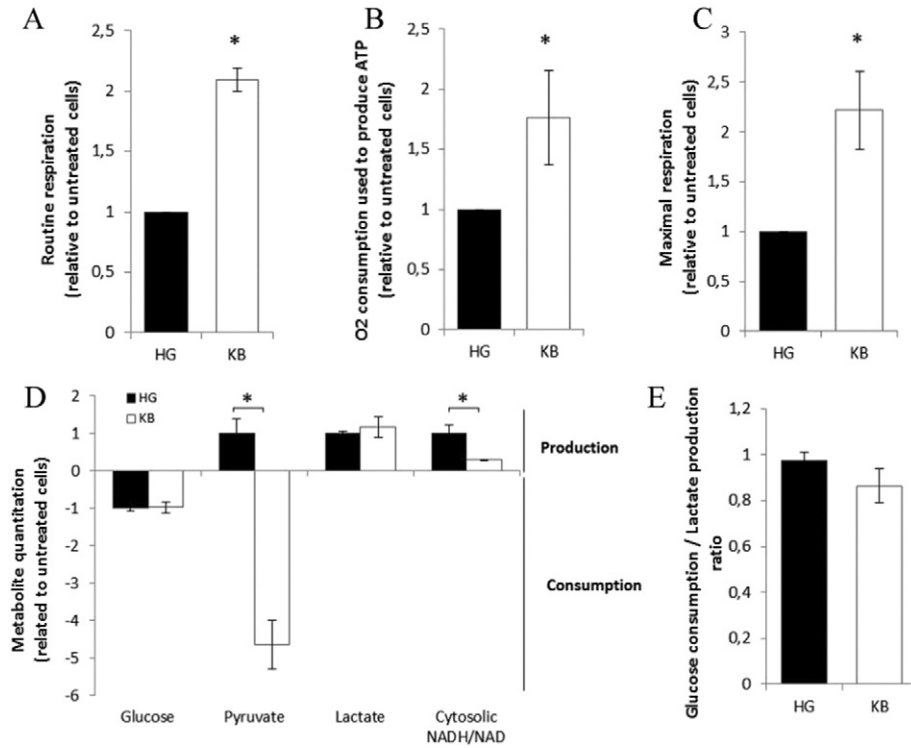


Fig. 2. Effects of 28 days of KB on mitochondrial respiration and metabolism in mutant cells. (A) Oxygraphic measurements of mitochondrial routine respiration of mutant cells under high glucose (HG) (black bars) or KB (white bars), $n \geq 3$. (B) Oxygraphic measurements of the routine respiration used to produce ATP of mutant cells under HG (black bars) or KB (white bars), $n \geq 3$. (C) Oxygraphic measurements of the maximal respiration of mutant cells under HG (black bars) or KB (white bars), $n \geq 3$. (D) Glucose consumption, pyruvate and lactate production and cytosolic NADH/NAD ratio of mutant cells under HG (black bars) or KB (white bars) treatment, $n \geq 4$. (E) Glucose consumption/lactate production ratio under HG (black bars) or KB (white bars), $n \geq 4$. The data are presented as mean \pm sem of the different experiments.

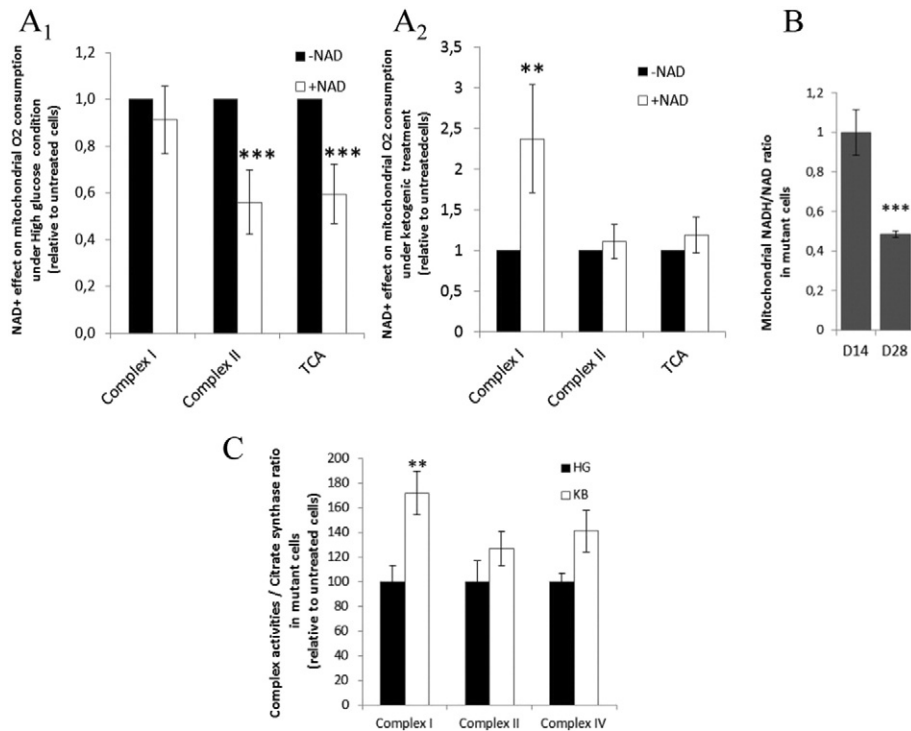


Fig. 3. Mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio and respiratory chain complex measurements. (A) Mitochondrial O₂ consumption measured on permeabilized cells: Complex I and II and TCA cycle-dependent respiratory rates without (black bars) or with the addition of NAD⁺ (white bars) under HG (A₁) or KB (A₂), $n \geq 5$. (B) Mitochondrial NADH/NAD ratio in KB treated cells at 14 and 28 days, $n \geq 7$. The mitochondrial NADH/NAD ratio was estimated through B-hydroxybutyrate/acetoacetate ratio. (C) Complex I, II and IV normalized to citrate synthase ratios after 28 days under HG (black bars) or KB (white bars), $n \geq 4$. The results are expressed as fold change relative to mean control cell values.

the end of the treatment, suggesting that the capability of NADH oxidation by complex I was increased in mutant cells (Fig. 3B).

3.5. Ketone bodies restore the activity and assembly of complex I

In connection with the previous results, the enzymatic activity of complex I was measured in treated and untreated mutant cells. After 14 days of KB, no change was observed compared to untreated cells (not shown). However, the KB significantly increased complex I activity compared to untreated cells after 28 days, without significant effect on complexes II and IV (Fig. 3C).

Complex I assembly of mutant cells was analyzed using BN-PAGE. A major assembly intermediate at 400 kDa was seen under HG standard condition (Fig. 4A). After 28 days of KB, assembly intermediates were drastically reduced and the proportion of complex I holoenzyme relative to the assembly intermediates was significantly increased compared to mutant cells grown in HG medium, from 72 to 98%, indicating a significant improvement of complex I assembly after long term exposure of KB (Fig. 4A right panel).

3.6. Ketone bodies do not change the mutant load but increase the mtDNA copy number

The m.3243A>G mutation rate was measured on a regular basis, but no difference of the mutant load was seen after 28 days of KB exposure (HG: 98.6% ± 0.1; KB: 98.7% ± 0.3). However, after 28 days, KB significantly increased the mtDNA copy number by 44% in mutant cells (Fig. 4B). Taken together, these results strongly suggest an increase of the absolute wild type mtDNA copy number in mutant cells due to KB treatment.

3.7. Ketone bodies promotes mitochondrial energetic metabolism in parental control cells

In order to determine the specific effects of the KB, the parental SH-SY5Y cells were exposed to KB treatment for 4 weeks of culture and different metabolites of cell metabolism were measured (Fig. S11A). After 28 days of treatment, the glucose consumption was not modified compared to standard culture condition but the pyruvate was massively used under KB treatment. The lactate production was significantly higher in KB treatment when compared to HG by approximately 2-fold. The cytosolic NADH/NAD ratio was not modified but the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio showed a 55% reduction after 28 days of KB, indicating that the NADH oxidation was also increased in parental cells (Fig. S11B).

The routine respiration of the control cells was not modified after 4 weeks of KB treatment (Fig. S11C). However, the part of this respiration used to produce ATP (i.e. the energetic efficiency) was increased

by 57% after KB treatment (Fig. S11D). The mtDNA copy number was increased by 70% in parental cells (Fig. S11E).

4. Discussion

Ketogenic diet, consisting a combination of high fat and low carbohydrate diet, appears as a promising therapy for mitochondrial disorders [23] but its beneficial effects and mechanisms of action are still unclear [8,24]. The ketogenic diet and similar diets have been used in a large variety of neurological and metabolic disorders [25,26]. Ketogenic diet has been used in several clinical studies to treat patients suffering from pharmaco-resistant epilepsies [13]. Seizure is part of the clinical phenotype in about 40% of children diagnosed with mitochondrial disease [15]. In a series of 14 children suffering from diverse mitochondrial diseases associated with intractable seizures, about 50% of patients became seizure-free after ketogenic diet but few of them did not show any benefit [27].

Several hypotheses have been raised regarding the mechanisms of neuroprotection of ketogenic diet. Ketogenic diet could have profound effects on neuronal plasticity and glutamate-mediated toxicity, reduces inflammation and improves bioenergetics by increasing ATP production and finally reduces ROS production, maybe through the induction of uncoupling proteins [26]. Although the effect of ketogenic diet is still not well understood, it is thought to mimic starvation when KB become the only fuel to fulfill the brain energetic requirements [28]. It was initially thought that ketogenic diet could promote the mitochondrial respiration through complex II activity and the oxidation of FADH₂, and therefore bypass the inactive complex I [16]. Hence, it was hypothesized that the resultant modification of the TCA cycle through the production of FADH₂ under ketogenic condition was the basis of the benefits of the regimen.

Among mitochondrial disorders, MELAS syndrome is considered as one of the most common maternally inherited diseases despite the fact that the pathogenicity of MELAS is still not well understood and we still have to come to a consensus for treating MELAS syndrome [9,10].

Our study demonstrates a significant reduction of complex I activity combined with a reduction of complex IV albeit not significant as seen previously as an hallmark of MELAS pathophysiology [29]. Hence, Complex I defect appears as a prevalent feature in MELAS as reported before [4–6].

Complex I is the largest enzyme complex of the mitochondrial oxidative phosphorylation system with at least 44 subunits and is also described as the main site of ROS production within mitochondria [30]. The essential role of complex I is highlighted by the fact that inherited CI deficiency is the most common OXPHOS disorder, occurring in up to 30% of mitochondrial diseases [31].

We have shown that the improvement of the mitochondrial metabolism in MELAS cybrid cells after 4 weeks of KB exposure is almost

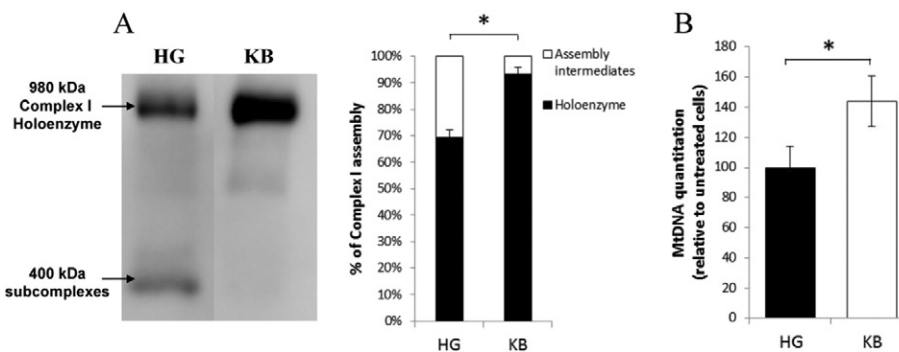


Fig. 4. Assembly of complex I assembly level and mtDNA copy number in mutant cells. (A) Blue-native PAGE analysis of respiratory chain complex I assembly after 28 days under HG or KB. The ratio of holoenzyme complexes and assembly intermediates were estimated as percentages, $n \geq 4$. (B) Mitochondrial mtDNA copy number in KB treated cells compared to HG medium, $n \geq 8$. The data are presented as mean + sem of experiments.

exclusively mediated through the re-assembly and stabilisation of complex I, dramatically reducing the level of assembly intermediates, and consequently improving complex I activity and the routine phosphorylating respiration dedicated to ATP synthesis (summarized in Fig. 5). In close connection, we have recently shown that the consequences of a misassembled complex I, and the accumulation of assembly intermediates were deleterious for the cell, by triggering ROS overproduction [32]. The level of complex I assembly intermediates was indeed strictly correlated with oxidative stress due to the presence of a still active N module of complex I which includes the catalytic domain responsible for NADH oxidation [32]. Hence, KB through the reassembly of complex I intermediates may act as an antioxidant process [26]. It was also shown that ketones prevented glutamate excitotoxicity in neocortical neurons by reducing oxidative stress following an enhancement of NADH oxidation and mitochondrial respiration [33]. In addition, increased longevity in mice was shown to be associated with an optimal assembly of mitochondrial complex I. Indeed, biogenesis of the mitochondrial complex I is highly dependent on coordinate steps of membrane insertion of mtDNA encoded subunits with the matrix part of complex I. Indeed, a disruption of complex I assembly with an accumulation of assembled matrix arm subcomplexes of complex I reduced mitochondrial respiration while increasing ROS production [34].

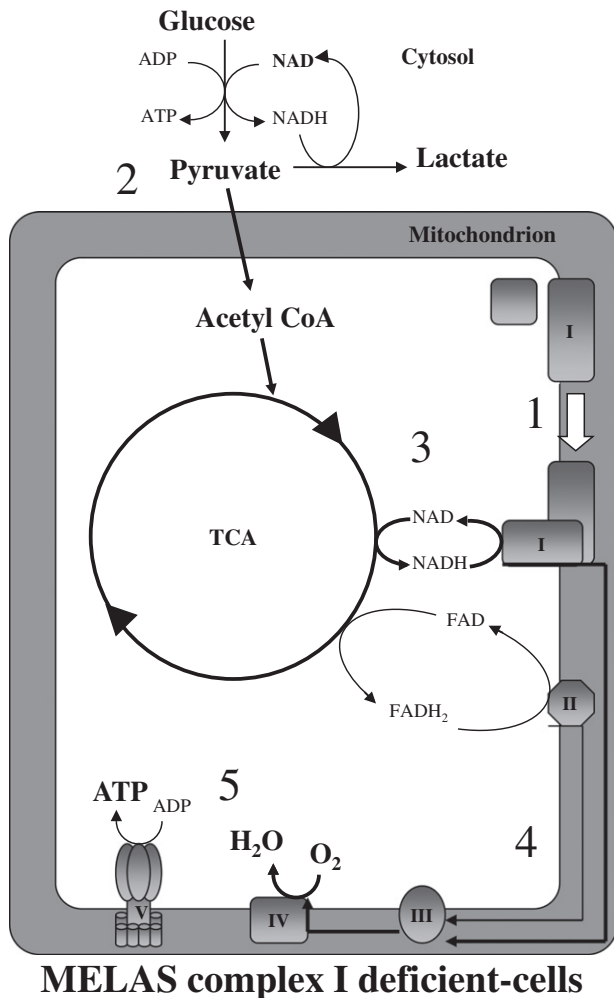


Fig. 5. Schematic representation of the respiratory chain and the effects of KB in MELAS cells. 1: Complex I assembly is restored under KB. 2: Mitochondrial metabolism is induced with the consumption of pyruvate, with a reduction of the cytosolic NADH/NAD ratio; 3: Complex I activity is increased, oxidizing NADH, reducing the mitochondrial NADH/NAD ratio; 4 and 5: Increase of mitochondrial respiration dedicated to ATP synthesis

A recent study has also shown that treatment of SH-SY5Y parental cells with decanoic acid (C10), a component of the medium chain triglyceride form of the ketogenic diet, increased citrate synthase and complex I activities, and the mitochondrial mass as well [35]. In our study, similar results were obtained when SH-SY5Y parental cells were exposed to KB for 4 weeks, promoting mitochondrial energetic metabolism with more ATP produced, through the mitochondrial respiration (Fig. S11), with a significant reduction of the mitochondrial NADH/NAD⁺ ratio and increasing the mtDNA copy number as well. However the lactate production was significantly higher in KB suggesting that the KB concentration used in our study was too high for the parental cells (Fig. S11).

The same C10 compound was also recently used in another study to expose fibroblast cells carrying nuclear-encoded mutations of complex I subunits responsible for Leigh syndrome during 6 days of cell culture [36]. As the main result, the supplementation using C10 had pleiotropic effects on mitochondrial metabolism of complex I mutant cells increasing citrate synthase activity in only 50% of patient cell lines and variable responses regarding ROS production or mitochondrial membrane potential in response to C10. Patient fibroblast cells carrying mutations in different genes encoding for key nuclear-encoded complex I subunits responded differently maybe in relation with the genetic defect. Mutant cells are more reliable on the glycolytic pathway due to a defective respiratory chain. Hence, reducing the level of glucose in the culture medium forces the cells to rely on mitochondrial respiration and alternative pathways to produce ATP. However, in the study of Kanabus et al. it is interesting to note that the same glucose concentration (25 mM) was kept during the treatment with C10 compared to untreated cells, which may interfere with the mitochondrial OXPHOS metabolism and may explain the cellular variability [36]. It has been suggested that glycolytic restriction is an important parameter to explain the anti-epileptic properties of the ketogenic diet [25]. In our study, to be as close as possible to the ketogenic regimen, which is also associated with low carbohydrates, KB were combined with a significant reduction of glucose concentration in the culture medium (0.5 g/L or 5 mM).

Interestingly enough, we have previously shown that the exposure of MELAS cells to low glucose alone (0.5 g/L) for 4 weeks shifted the heteroplasmy level from nearly 100% to 90% [18]. Shifting the level of heteroplasmy towards normal mtDNA and reducing the mutant load has become the goal of a large variety of invasive or non-invasive therapeutic approaches. This is consistent with data from cultured cells in which the mutant percentage of the m.3243A>G must exceed 90% before both protein synthesis and O₂ consumption decline [37]. Hence, a small decrease in mutant load or even a few percent increase of wild-type mtDNA copies in cells as seen in our study might be enough to rescue the phenotype if it passes under a pathogenic threshold of mtDNA mutation [38].

Moreover, KB has been also shown to reduce the percentage of deleted mtDNA molecules in cells carrying large-scale heteroplasmic deletions after only 5 days of treatment [19]. In our study, the KB did not change the percentage of mutant load which remained around 98.7%, suggesting that the improvement of mitochondrial complex I assembly and activity was not due to a change in heteroplasmy. The reason why the mutant load was stable using a similar dose of ketones compared to the study of Santra et al. on cybrid cells carrying mtDNA deleted molecules is not well understood. Possible explanations are the different cell types that were used in both studies (143B cells vs neuronal cells) and maybe due to the mechanism of counter selecting deleted mtDNA molecules.

However, the mtDNA copy number of treated mutant cells under KB treatment was significantly higher compared to untreated cells indicating that the absolute amount of wild type mtDNA copy number was higher in mutant cells due to KB treatment. It has been shown that the mutant load is an important parameter but not sufficient to explain the variability of clinical phenotypes of mtDNA-related disorders. For instance, Leber's hereditary optic neuropathy (LHON), a maternally

inherited optic atrophy due to mtDNA mutations is one of the most frequent mitochondrial diseases and is also characterized by incomplete penetrance. A clear difference between asymptomatic LHON carriers and affected patients was seen in stimulating mtDNA replication highlighting the role of the mtDNA copy number as a possible explanation for the variable penetrance in LHON, and considered as a possible predictive genetic biomarker [39].

Finally, a 22-year-old MELAS patient was treated with a ketogenic diet for about a year showing benefits in decreasing the frequency of stroke like episodes, although the mutant load or mtDNA copy number was not evaluated in this patient [16]. The next step is obviously to demonstrate the efficacy of the diet in MELAS using a randomized clinical trial. In such trial, it will be important to consider the type of KB given to the patients, as well as the duration of the effects of the regimen. Safety, tolerability and efficacy of KB has already been evaluated in different clinical trials for refractory epilepsy [27,40–43] as well as in patients affected with mitochondrial disorders associated with intractable epilepsy [15].

5. Conclusions

In conclusion, we provide evidence about the interest of the KB supplementation in a neuronal model of MELAS cells. The level of CI assembly appears as a crucial parameter in alleviating complex I deficiency in mutant cells treated with KB. Hence, KB may appear as an alternative strategy to improve mitochondrial function, especially in MELAS, or more generally in mitochondrial disorders caused by complex I deficiency.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2016.10.028>.

Transparency document

The Transparency document associated with this article can be found, in the online version.

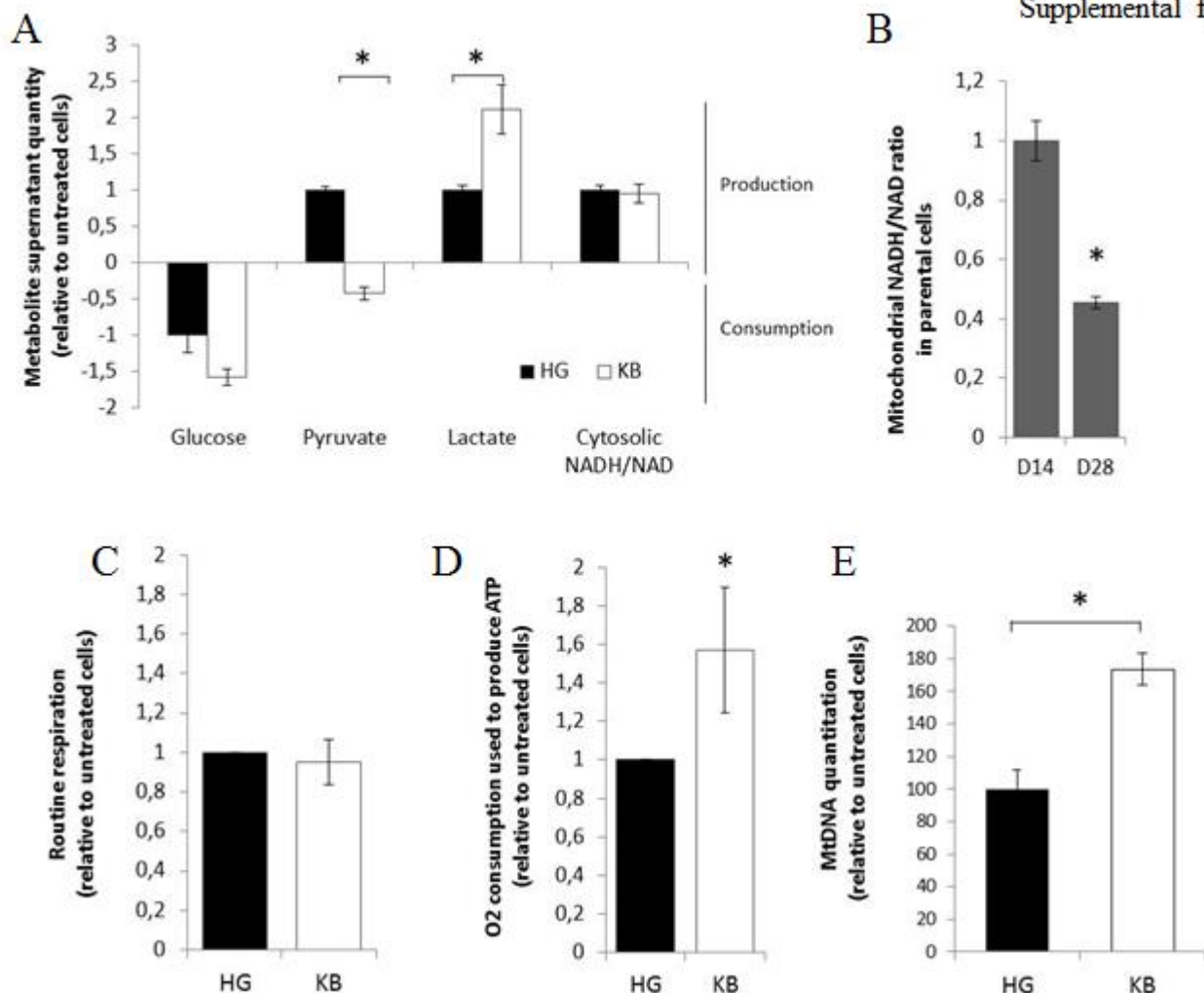
Acknowledgments

This work was supported by grants from the following research institutions: “Fondation pour la Recherche Médicale” DPM20121125554, “Association Française les myopathies” (MitoScreen 17122), “Région Pays de la Loire” (Mitovasc 1646), “Union Nationale des Aveugles et Déficiants Visuels”, “Retina France”, “Ouvrir les Yeux”, and “Association contre les Maladies Mitochondriales”.

References

- [1] S.G. Pavlakis, P.C. Phillips, S. DiMauro, D.C. De Vivo, L.P. Rowland, Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: a distinctive clinical syndrome, *Ann. Neurol.* 16 (1984) 481–488.
- [2] J. Finsterer, Inherited mitochondrial disorders, *Adv. Exp. Med. Biol.* 942 (2012) 187–213.
- [3] Y. Goto, I. Nonaka, S. Horai, A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies, *Nature* 348 (1990) 651–653.
- [4] D.R. Dunbar, P.A. Moonie, M. Zeviani, I.J. Holt, Complex I deficiency is associated with 3243G:C mitochondrial DNA in osteosarcoma cell hybrids, *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 123–129.
- [5] K. Majamaa, H. Rusanen, A. Remes, I.E. Hassinen, Metabolic interventions against complex I deficiency in MELAS syndrome, *Mol. Cell. Biochem.* 174 (1997) 291–296.
- [6] R.H. Hamalainen, T. Manninen, H. Koivumaki, M. Kislin, T. Otonkoski, A. Suomalainen, Tissue- and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A>G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) E3622–E3630.
- [7] E. Fassone, S. Rahman, Complex I deficiency: clinical features, biochemistry and molecular genetics, *J. Med. Genet.* 49 (2012) 578–590.
- [8] D.C. Wallace, W. Fan, V. Procaccio, Mitochondrial energetics and therapeutics, *Annu. Rev. Pathol.* 5 (2010) 297–348.
- [9] Y. Koga, M. Ishibashi, I. Ueki, S. Yatsuga, R. Fukiyama, Y. Akita, T. Matsuishi, Effects of L-arginine on the acute phase of strokes in three patients with MELAS, *Neurology* 58 (2002) 827–828.
- [10] Y. Koga, N. Povalko, J. Nishioka, K. Katayama, S. Yatsuga, T. Matsuishi, Molecular pathology of MELAS and L-arginine effects, *Biochim. Biophys. Acta* 1820 (2012) 608–614.
- [11] D.M. Sproule, P. Kaufmann, Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: basic concepts, clinical phenotype, and therapeutic management of MELAS syndrome, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1142 (2008) 133–158.
- [12] K.J. Bough, J.M. Rho, Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet, *Epilepsia* 48 (2007) 43–58.
- [13] K. Martin, C.F. Jackson, R.G. Levy, P.N. Cooper, Ketogenic diet and other dietary treatments for epilepsy, *Cochrane Database Syst. Rev.* 2 (2016), CD001903.
- [14] M. Lee, The use of ketogenic diet in special situations: expanding use in intractable epilepsy and other neurologic disorders, *Korean J. Pediatr.* 55 (2012) 316–321.
- [15] H.C. Kang, Y.M. Lee, H.D. Kim, Mitochondrial disease and epilepsy, *Brain Dev.* 35 (2013) 757–761.
- [16] C. Steriade, D.M. Andrade, H. Faghfoury, M.A. Tarnopolsky, P. Tai, Mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) may respond to adjunctive ketogenic diet, *Pediatr. Neurol.* 50 (2014) 498–502.
- [17] S. Rahman, Mitochondrial disease and epilepsy, *Dev. Med. Child Neurol.* 54 (2012) 397–406.
- [18] V. Desquiret-Dumas, N. Gueguen, M. Barth, A. Chevrollier, S. Hancock, D.C. Wallace, P. Amati-Bonneau, D. Henrion, D. Bonneau, P. Reynier, V. Procaccio, Metabolically induced heteroplasmy shifting and L-arginine treatment reduce the energetic defect in a neuronal-like model of MELAS, *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (2012) 1019–1029.
- [19] S. Santra, R.W. Gilkerson, M. Davidson, E.A. Schon, Ketogenic treatment reduces deleted mitochondrial DNAs in cultured human cells, *Ann. Neurol.* 56 (2004) 662–669.
- [20] C. Angebault, N. Gueguen, V. Desquiret-Dumas, A. Chevrollier, V. Guillet, C. Verny, J. Cassereau, M. Ferre, D. Milea, P. Amati-Bonneau, D. Bonneau, V. Procaccio, P. Reynier, D. Loiseau, Idebenone increases mitochondrial complex I activity in fibroblasts from LHON patients while producing contradictory effects on respiration, *BMC Res. Notes* 4 (2011) 557.
- [21] V. Desquiret-Dumas, N. Gueguen, G. Leman, S. Baron, V. Nivet-Antoine, S. Chupin, A. Chevrollier, E. Vessieres, A. Ayer, M. Ferre, D. Bonneau, D. Henrion, P. Reynier, V. Procaccio, Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 36662–36675.
- [22] R.L. Veech, The therapeutic implications of ketone bodies: the effects of ketone bodies in pathological conditions: ketosis, ketogenic diet, redox states, insulin resistance, and mitochondrial metabolism, *Prostaglandins Leukot. Essent. Fat. Acids* 70 (2004) 309–319.
- [23] A.F. Branco, A. Ferreira, R.F. Simoes, S. Magalhaes-Novais, C. Zehowski, E. Cope, A.M. Silva, D. Pereira, V.A. Sarda, T. Cunha-Oliveira, Ketogenic diets: from cancer to mitochondrial diseases and beyond, *Eur. J. Clin. Investig.* (2016).
- [24] V. Procaccio, C. Bris, J.M. Chao de la Barca, F. Oca, A. Chevrollier, P. Amati-Bonneau, D. Bonneau, P. Reynier, Perspectives of drug-based neuroprotection targeting mitochondria, *Rev. Neurol. (Paris)* 170 (2014) 390–400.
- [25] L.B. Gano, M. Patel, J.M. Rho, Ketogenic diets, mitochondria, and neurological diseases, *J. Lipid Res.* 55 (2014) 2211–2228.
- [26] C.E. Stafstrom, J.M. Rho, The ketogenic diet as a treatment paradigm for diverse neurological disorders, *Front. Pharmacol.* 3 (2012) 59.
- [27] H.C. Kang, Y.M. Lee, H.D. Kim, J.S. Lee, A. Slama, Safe and effective use of the ketogenic diet in children with epilepsy and mitochondrial respiratory chain complex defects, *Epilepsia* 48 (2007) 82–88.
- [28] A. Paoli, A. Bianco, E. Damiani, G. Bosco, Ketogenic diet in neuromuscular and neurodegenerative diseases, *Biomed. Res. Int.* 2014 (2014) 474296.
- [29] A. Naini, P. Kaufmann, S. Shanske, K. Engelstad, D.C. De Vivo, E.A. Schon, Hypocitrullinemia in patients with MELAS: an insight into the “MELAS paradox”, *J. Neurol. Sci.* 229–230 (2005) 187–193.
- [30] C. Hunte, V. Zickermann, U. Brandt, Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I, *Science* 329 (2010) 448–451.
- [31] S. Koene, R.J. Rodenburg, M.S. van der Knaap, M.A. Willemsen, W. Sperl, V. Laugel, E. Ostergaard, M. Tarnopolsky, M.A. Martin, V. Nesbitt, J. Fletcher, S. Edvardson, V. Procaccio, A. Slama, L.P. van den Heuvel, J.A. Smeitink, Natural disease course and genotype-phenotype correlations in Complex I deficiency caused by nuclear gene defects: what we learned from 130 cases, *J. Inher. Metab. Dis.* 35 (2012) 737–747.
- [32] G. Leman, N. Gueguen, V. Desquiret-Dumas, M.S. Kane, C. Wetterval, S. Chupin, A. Chevrollier, A.S. Lebre, J.P. Bonnefont, M. Barth, P. Amati-Bonneau, C. Verny, D. Henrion, D. Bonneau, P. Reynier, V. Procaccio, Assembly defects induce oxidative stress in inherited mitochondrial complex I deficiency, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 65 (2015) 91–103.
- [33] M. Maalouf, P.G. Sullivan, L. Davis, D.Y. Kim, J.M. Rho, Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation, *Neuroscience* 145 (2007) 256–264.
- [34] S. Miwa, H. Jow, K. Baty, A. Johnson, R. Czapiewski, G. Saretzki, A. Treumann, T. von Zglinicki, Low abundance of the matrix arm of complex I in mitochondria predicts longevity in mice, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3837.
- [35] S.D. Hughes, M. Kanabus, G. Anderson, I.P. Hargreaves, T. Rutherford, M. O'Donnell, J.H. Cross, S. Rahman, S. Eaton, S.J. Heales, The ketogenic diet component decanoic acid increases mitochondrial citrate synthase and complex I activity in neuronal cells, *J. Neurochem.* 129 (2014) 426–433.
- [36] M. Kanabus, E. Fassone, S.D. Hughes, S.F. Biloei, T. Rutherford, M.O. Donnell, S.J. Heales, S. Rahman, The pleiotropic effects of decanoic acid treatment on mitochondrial function in fibroblasts from patients with complex I deficient Leigh syndrome, *J. Inher. Metab. Dis.* 39 (2016) 415–426.
- [37] G. Attardi, M. Yoneda, A. Chomyn, Complementation and segregation behavior of disease-causing mitochondrial DNA mutations in cellular model systems, *Biochim. Biophys. Acta* 1271 (1995) 241–248.

- [38] D.C. Wallace, Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine, *Annu. Rev. Biochem.* 76 (2007) 781–821.
- [39] C. Giordano, L. Iommarini, L. Giordano, A. Maresca, A. Pisano, M.L. Valentino, L. Caporali, R. Liguori, S. Deceglie, M. Roberti, F. Fanelli, F. Fracasso, F.N. Ross-Cisneros, P. D'Adamo, G. Hudson, A. Pyle, P. Yu-Wai-Man, P.F. Chinnery, M. Zeviani, S.R. Salomao, A. Berezovsky, R. Belfort Jr., D.F. Ventura, M. Moraes, M.M. Filho, P. Barboni, F. Sadun, A. De Negri, A.A. Sadun, A. Tancredi, M. Mancini, G. d'Amati, P. Loguercio Polosa, P. Cantatore, V. Carelli, Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy, *Brain* 137 (2014) 335–353.
- [40] K.S. Taub, S.K. Kessler, A.G. Bergqvist, Risk of seizure recurrence after achieving initial seizure freedom on the ketogenic diet, *Epilepsia* 55 (2014) 579–583.
- [41] J. Finsterer, S. Kothari, Is ketogenic diet truly effective in mitochondrial epilepsy? *Pediatr. Neurol.* 51 (2014), e5.
- [42] A. Dressler, P. Trimmel-Schwahofer, E. Reithofer, A. Muhlebner, G. Groppel, E. Reiter-Fink, F. Benninger, R. Grassl, M. Feucht, Efficacy and tolerability of the ketogenic diet in Dravet syndrome - comparison with various standard antiepileptic drug regimen, *Epilepsy Res.* 109 (2015) 81–89.
- [43] J.H. Seo, Y.M. Lee, J.S. Lee, H.C. Kang, H.D. Kim, Efficacy and tolerability of the ketogenic diet according to lipid:nonlipid ratios—comparison of 3:1 with 4:1 diet, *Epilepsia* 48 (2007) 801–805.



Supplemental Fig. SI1. Effect of the KB treatment on parental control cells. (A) Glucose consumption, pyruvate and lactate production and cytosolic NADH/NAD ratio of mutant cells under HG (black bars) or after 28 days of KB treatment (white bars) $n \geq 4$. The data are presented as mean \pm sem of the different experiments. The asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$). (B) Mitochondrial NADH/NAD ratio in parental treated cells at 14 and 28 days, $n \geq 7$. The mitochondrial NADH/NAD ratio was estimated through B-hydroxybutyrate/acetoacetate ratio. (C) O₂ Mitochondrial routine respiration of parental cells after 28 days under HG (black bars) or KB treatment (white bars) $n \geq 4$. (D) Part of the routine respiration used to produce ATP of control cells after 28 days under HG (black bars) or KB treatment (white bars) $n \geq 4$. (E) Mitochondrial mtDNA copy number in parental treated cells compared to HG medium, $n \geq 6$. The data are presented as mean + sem of experiments.

1.3. Résultats/Discussion et Perspectives

a) Confirmation d'un métabolisme oxydatif altéré dans les cybrides MELAS

Dans un premier temps, cette étude a consisté à la caractérisation fonctionnelle sur le plan de la respiration mitochondriale ainsi que sur l'activité des différents complexes de la chaîne mitochondriale pour des cybrides SH-SY5Y contrôles comparés à des cybrides mutants ayant un taux d'hétéroplasmie de 98% pour le variant m.3243A>G. Nous avons montré une diminution de la respiration mitochondriale de routine, cette diminution avait également été retrouvée dans des lignées 143B modèles de la mutation commune MELAS (Dunbar et al., 1996). Nous avons également retrouvé une diminution de la respiration destinée à la synthèse d'ATP, ainsi qu'une diminution de la capacité maximale de la chaîne respiratoire. En parallèle à cette altération de la respiration mitochondriale dans les cybrides MELAS nous avons retrouvé une diminution significative de l'activité enzymatique du complexe I de la chaîne mitochondriale, mais en revanche aucun changement significatif pour les autres complexes. Au niveau de l'assemblage du complexe I, nous avons retrouvé des intermédiaires d'assemblage de 400 kDa, ce résultat confirme des données antérieures réalisées au laboratoire (Desquiret-Dumas et al., 2012). Le métabolisme mitochondrial est également perturbé dans la lignée MELAS, avec un métabolisme glycolytique prédominant pour les cellules mutantes (utilisation préférentielle du glucose, production accrue de lactates, ratio NADH/NAD augmenté).

b) Amélioration de la respiration mitochondriale et du métabolisme oxydatif des cybrides MELAS après traitement avec les corps cétoniques

Après un traitement aux corps cétoniques de 28 jours, nous avons pu observer une augmentation de la respiration de routine, de la respiration liée à la synthèse ATP et de la capacité maximale de respiration pour les cybrides MELAS comparés aux cellules non exposées. Ces données illustrent une amélioration du métabolisme oxydatif pour ces cellules mutantes. En parallèle nous avons montré un « switch » métabolique vers un métabolisme mitochondrial prédominant pour les cellules traitées par les corps cétoniques avec une consommation préférentielle du pyruvate et un ratio NADH/NAD diminué démontrant l'oxydation du NADH par le complexe I.

Ce traitement a également permis d'obtenir une augmentation nette de l'activité du complexe I ainsi qu'une augmentation non significative des complexes II et IV. Sur le plan clinique, l'étude de *Kang et al.*, a montré que l'utilisation du régime cétogène améliore la symptomatologie et réduit les AVC pour la moitié des 14 patients présentant une épilepsie pharmaco-résistante associée à des anomalies mitochondriales dans les complexes I, II et IV (Kang et al., 2007). Il a été suggéré un « bypass » du complexe I altéré en fournissant plus

d'équivalents réduits au complexe II fonctionnel lors de l'exposition aux corps cétoniques (Steriade et al., 2014).

Une étude a également suggéré que l'apport de corps cétoniques à des neurones corticaux de rat passerait préférentiellement par le complexe I (Maalouf et al., 2007). En effet ils ont montré que les corps cétoniques inhibent l'excitotoxicité du glutamate sur les fonctions mitochondriales, notamment via la production de ROS et l'augmentation de l'oxydation du NADH (Maalouf et al., 2007).

c) **Amélioration de l'assemblage du complexe I de la chaîne mitochondriale et augmentation de la quantité d'ADNmt après traitement par les corps cétoniques dans les cybrides MELAS**

En lien avec l'hypothèse de Maalouf et al, (Maalouf et al., 2007) lors d'une étude antérieure du laboratoire, nous avons montré que le désassemblage du complexe I avec la présence d'intermédiaires d'assemblage est délétère pour le fonctionnement cellulaire et est à l'origine de l'augmentation de la production de ROS (Leman et al., 2015). Nous avons retrouvé dans notre étude la présence d'intermédiaires d'assemblage estimés à une taille de 400 kDa pour les cybrides MELAS, confirmant donc ces résultats (Desquiret-Dumas et al., 2012). Le traitement avec les corps cétoniques améliore significativement l'assemblage du complexe I, après 28 jours de traitement on constate une augmentation significative de l'holoenzyme pour les cybrides mutés par rapport aux cellules non traitées. Nous avons ainsi mis en évidence une amélioration du métabolisme des cybrides MELAS après exposition aux corps cétoniques grâce au réassemblage du complexe I, améliorant ainsi son activité et la respiration phosphorylante dédiée à la synthèse ATP.

L'étude de *Santra* sur des cellules 143B mutantes MELAS traitées pendant 5 jours avec des corps cétoniques a montré une réduction du taux de délétion et un retour vers le phénotype sauvage (Santra et al., 2004). Des études précédentes réalisées au laboratoire ont également montré une réduction de l'hétéroplasmie de 10% pour les cellules cybrides mutantes SH-SY5Y après 4 semaines sous restriction glucidique (Desquiret-Dumas et al., 2012). Néanmoins un traitement de 28 jours aux corps cétoniques n'a pas modifié le taux d'hétéroplasmie de ces cellules. En effet, ce taux est resté à 98.7%. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer cette disparité constatée entre les études de *Santra* et de *Desquiret*. Tout d'abord, les lignées utilisées sont différentes avec d'un côté des cellules d'ostéosarcome 143B et de l'autre des cellules neuronales SHSY-5Y. Les mécanismes de sélection divergerait et serait donc cellule- et/ou organe-dépendant. D'autre part on peut penser que la composante restriction calorique dans le régime cétogène a des effets bien définis, puisque celui-ci entraîne une réduction de l'hétéroplasmie alors que l'ajout de corps cétoniques ne modifie pas le taux de mutation.

Toutefois nous avons retrouvé un nombre de copie d'ADNmt plus important dans les cellules mutantes exposées aux corps cétoniques par rapport aux cellules non traitées. Nous pouvons encore une fois émettre une hypothèse d'un mécanisme spécifique et propre au régime cétogène. L'étude de *Garcia-Roves* a montré que l'introduction d'un régime riche en graisses sur des rats augmente la biogenèse mitochondriale dans le muscle (Garcia-Roves et al., 2007). En effet cela se traduirait par une augmentation des enzymes mitochondriales de la voie d'oxydation des acides gras, du cycle du citrate, de la chaîne respiratoire ainsi qu'une augmentation du nombre de copies d'ADNmt. De plus *Carelli et al* ont suggéré que la pénétrance incomplète (individu qui portent la mutation sans développé de symptômes de la pathologie) constatée dans la maladie de Leber serait en lien avec les variations du nombre de copies d'ADNmt et de la biogénèse mitochondriale (Caporali et al., 2017). En effet de nombreuses études montrent une augmentation de la biogénèse mitochondriale et de la quantité d'ADNmt lors d'un dysfonctionnement mitochondrial (Bentlage and Attardi, 1996; Toompuu et al., 1999; Wredenberg et al., 2002). De plus, il a été montré que des patients asymptomatiques porteurs d'une mutation dans l'ADNmt présentent également une plus grande quantité d'ADNmt (Bianco et al., 2016; Giordano et al., 2014).

Nous pouvons alors penser que dans notre modèle cellulaire l'exposition aux corps cétoniques conduit à un mécanisme majeur chez les cellules mutées. Une augmentation du nombre de copies ADNmt, augmenterait donc le nombre de copies sauvages et de ce fait permettrait de disposer de suffisamment de mitochondriales normales pour franchir le seuil énergétique nécessaire à un fonctionnement cellulaire normal. Ces résultats suggèrent aussi une chronologie de mise en place des mécanismes de compensation en lien avec ces stratégies métaboliques.

2. Réduction des intermédiaires d'assemblage du complexe I via la restriction calorique dans les cybrides MELAS

2.1. Introduction

Les déficits du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale sont les plus communément retrouvés dans les pathologies mitochondriales (Skladal et al., 2003). La dysfonction du complexe I peut être due à des défauts d'activité enzymatique ou d'assemblage. Néanmoins le processus d'assemblage du complexe I reste à ce jour encore mal compris et le fait que les sous-unités qui le composent soit dépendantes à la fois du génome nucléaire et mitochondriale complexifie d'autant plus son étude. Malgré tout, grâce à la découverte de nombreuses mutations, en particulier pour les gènes nucléaires conduisant à un défaut spécifique du complexe I et entraînant une maladie mitochondriale (Stenton SL, Prokisch H. EBioMedicine. 2020), un grand nombre de facteurs impliqués dans l'assemblage du complexe I ont été mis en évidence. Ils permettent à ce jour de mieux comprendre son mécanisme et son importance dans les pathologies mitochondriales (Guerrero-Castillo et al., 2017).

2.2. Article

BBA - Molecular Basis of Disease 1864 (2018) 1596–1608



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

BBA - Molecular Basis of Disease

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



The accumulation of assembly intermediates of the mitochondrial complex I matrix arm is reduced by limiting glucose uptake in a neuronal-like model of MELAS syndrome

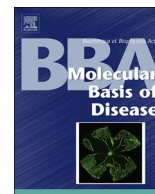


Guillaume Geffroy^a, Rayane Benyahia^a, Samuel Frey^a, Valerie Desquiret-Dumas^{a,b}, Naig Gueguen^{a,b}, Celine Bris^{a,b}, Sophie Belal^a, Aurore Inisan^a, Aurelie Renaud^a, Arnaud Chevrollier^a, Daniel Henrion^a, Dominique Bonneau^{a,b}, Franck Letournel^c, Guy Lenaers^a, Pascal Reynier^{a,b}, Vincent Procaccio^{a,b,*}

^a UMR CNRS 6015-INSERM U1083, MitoVasc Institute, Angers University, Angers, France

^b Biochemistry and Genetics Department, Angers Hospital, F-49000, France

^c UMR INSERM 1066 - CNRS 6021MINT laboratory, Angers University, Angers, France



The accumulation of assembly intermediates of the mitochondrial complex I matrix arm is reduced by limiting glucose uptake in a neuronal-like model of MELAS syndrome

Guillaume Geffroy^a, Rayane Benyahia^a, Samuel Frey^a, Valerie Desquiret-Dumas^{a,b}, Naig Gueguen^{a,b}, Celine Bris^{a,b}, Sophie Belal^a, Aurore Inisan^a, Aurelie Renaud^a, Arnaud Chevrollier^a, Daniel Henrion^a, Dominique Bonneau^{a,b}, Franck Letournel^c, Guy Lenaers^a, Pascal Reynier^{a,b}, Vincent Procaccio^{a,b,*}

^a UMR CNRS 6015-INSERM U1083, MitoVasc Institute, Angers University, Angers, France

^b Biochemistry and Genetics Department, Angers Hospital, F-49000, France

^c UMR INSERM 1066 - CNRS 6021MINT laboratory, Angers University, Angers, France

ARTICLE INFO

Keywords:

Mitochondrial diseases
MELAS syndrome
Complex I assembly
Glucose restriction
Ketogenic diet
AICAR

ABSTRACT

Ketogenic diet (KD) which combined carbohydrate restriction and the addition of ketone bodies has emerged as an alternative metabolic intervention used as an anticonvulsant therapy or to treat different types of neurological or mitochondrial disorders including MELAS syndrome. MELAS syndrome is a severe mitochondrial disease mainly due to the m.3243A > G mitochondrial DNA mutation. The broad success of KD is due to multiple beneficial mechanisms with distinct effects of very low carbohydrates and ketones.

To evaluate the metabolic part of carbohydrate restriction, transmitochondrial neuronal-like cybrid cells carrying the m.3243A > G mutation, shown to be associated with a severe complex I deficiency was exposed during 3 weeks to glucose restriction. Mitochondrial enzyme defects were combined with an accumulation of complex I (CI) matrix intermediates in the untreated mutant cells, leading to a drastic reduction in CI driven respiration. The severe reduction of CI was also paralleled in post-mortem brain tissue of a MELAS patient carrying high mutant load.

Importantly, lowering significantly glucose concentration in cell culture improved CI assembly with a significant reduction of matrix assembly intermediates and respiration capacities were restored in a sequential manner. In addition, OXPHOS protein expression and mitochondrial DNA copy number were significantly increased in mutant cells exposed to glucose restriction. The accumulation of CI matrix intermediates appeared as a hallmark of MELAS pathophysiology highlighting a critical pathophysiological mechanism involving CI disassembly, which can be alleviated by lowering glucose fuelling and the induction of mitochondrial biogenesis, emphasizing the usefulness of metabolic interventions in MELAS syndrome.

1. Introduction

Mitochondria are considered as the power plant of the cells, producing ATP through Oxidative Phosphorylation (OXPHOS) embedded in the inner mitochondrial membrane [1]. Mitochondria are encoded by both nuclear and mitochondrial genomes and mitochondrial diseases are the consequences of mutations in either the nuclear genome or the mitochondrial DNA (mtDNA) leading to mitochondrial dysfunction

[2,3]. The mitochondrial genome encodes for 22 transfer RNAs (tRNAs) and 2 ribosomal RNAs (rRNAs) required for the translation of 13 polypeptides, all included in OXPHOS complexes [1].

One of the most frequently encountered mtDNA mutations causing age-related neuromuscular disease is the m.3243A > G variant which when there is a high percentage of mutant mtDNA is associated with the life-threatening MELAS syndrome (Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes syndrome; MELAS, OMIM

Abbreviations: CI, Complex I; CII, Complex II; OXPHOS, Oxidative Phosphorylation; mtDNA, mitochondrial DNA; ND, NADH Dehydrogenase; NADH, Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrate; NAD⁺, Nicotinamide Adenine Dinucleotide; ROS, Reactive Oxygen Species; kDa, Kilo Dalton; BN-PAGE, Blue Native PAGE; HG, High Glucose; KD, Ketogenic Diet; TCA, tricarboxylic acid cycle

* Corresponding author at: Biochemistry and Genetics Laboratory, Angers University Hospital, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France.

E-mail address: ViProcaccio@chu-angers.fr (V. Procaccio).

<https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.02.005>

Received 24 July 2017; Received in revised form 7 February 2018; Accepted 8 February 2018

Available online 14 February 2018

0925-4439/ © 2018 Elsevier B.V. All rights reserved.

540000) [4]. MELAS syndrome has been considered as one of the most common mtDNA disorders. The severity of the mitochondrial disorder is determined by the heteroplasmic rate which is the coexistence of a mixture of the wild type and mutant mtDNA copies, a situation known as heteroplasmy [1]. The m.3243A > G affects the *MT-TL1* gene coding for the tRNA^{Leu(UUR)} leading to the disruption of the structure, stability, amino-acylation and codon recognition of the tRNA^{Leu}, reducing the mitochondrial translation efficiency [5–7]. Diagnosis of MELAS syndrome is based on clinical symptoms and genetic testing. About 80% of cases of MELAS syndrome are due to the presence of the m.3243A > G in *MT-TL1*. Additional pathogenic mutations have been also identified in other tRNAs or NADH Dehydrogenase (ND) subunits [8,9]. Indeed, MELAS syndrome is either due to tRNA mutations affecting protein synthesis but several pathogenic variants targeting ND genes (ND5, ND1 and ND6 subunits) have been associated with MELAS syndrome highlighting the implication of complex I in MELAS pathophysiology [8].

MELAS syndrome is clinically characterized by a triad of cardinal symptoms: lactic acidosis, stroke like episodes before the age of 40 and encephalopathy [8]. This syndrome which may affect several organs, is also heterogeneous at the clinical point of view and associated with a broad spectrum of additional symptoms and secondary clinical manifestations such as epilepsy, exercise intolerance and myopathy, dementia, deafness and many others [10].

The disease is also commonly associated with multiple partial respiratory chain defects, especially involving complex I and/or complex IV deficiencies [4,11–13]. However, complex I deficiency is often considered as a key component of MELAS pathophysiology as reported into the literature [14–16]. A severe reduction of complex I activity was also identified in a neuronal-like model of MELAS [17].

Complex I (CI, NADH ubiquinone oxidoreductase) encompasses 44 subunits that are assembled into the mitochondrial matrix and inner membrane to form the mature holoenzyme [18–20]. A total of 14 core subunits and 30 supernumerary subunits constitute the L-shaped structure of the 980 kDa active complex, composed of two arms: a hydrophilic peripheral arm protruding into the matrix comprising the N-module responsible for NADH oxidation, the Q-module that transfers electrons through Fe/S clusters to the ubiquinone, and a hydrophobic arm embedded in the inner membrane that transfers protons from the matrix to the intermembrane space [21–24].

Due to the large number of subunits, the assembly of CI is critical and recent studies led to a consensus model [18,19], in which in the early assembly phase, an intermediate corresponding to the future Q-module is assembled in the matrix and anchored the mtDNA-encoded subunit ND1 through NDUFAF3 and NDUFAF4 assembly factors, to form the Q/P-a module. In parallel, a central submodule P_p-b is formed containing four of the seven mitochondrially-encoded subunits (ND2, ND3, ND4L, and ND6) and several accessory subunits. This P_p-b incorporates either the Q/P-a module or the P_D-a subassembly complex composed by NDUFB6 and ND4 to form the Q/P_p and the P_p-b/P_D-a intermediates respectively. Those CI subassemblies combine with a ND5 containing module to produce the Q/P module. The last step of the assembly process corresponds to the addition of the N-module to the Q/P intermediate, leading to the fully assembled and functional CI holoenzyme [18,19]. Perturbations of this dynamic process are associated to a reduction of the amount of CI holoenzyme, and an accumulation of assembly intermediates, triggering complex dysfunction [20,25–30].

Despite considerable efforts to better understand the pathophysiology of mitochondrial disorders, there is no effective cure for mitochondrial diseases [1,13]. MELAS patients have been treated with several compounds which include coenzyme Q10 and vitamins supplementations that often failed to chronically improve the clinical outcome of MELAS patients [1,12]. L-arginine and citrulline have been used to treat stroke-like episodes of MELAS [31]. Very recently ketogenic diet has driven a lot of interest from clinicians and neurologists to treat patients with neurological disorders including MELAS patients

[32–34]. Interestingly enough, ketogenic diet which is a combination of carbohydrate restriction and the addition of ketone bodies has been proposed as a treatment for pharmaco-resistant epilepsies for decades [35]. Observations of the physiological consequences imposed by low carbohydrate exposure on mitochondrial function are needed to better understand the potential benefits of KD in patients.

We have previously shown that MELAS neuronal-like cybrids carrying the m.3243A > G are associated with a severe reduction of CI activity and assembly and a non-significant reduction of CIV activity, in line with previous results obtained on MELAS patient fibroblasts and muscle biopsies [14–17,36]. Nevertheless, the nature and the consequences of these assembly intermediates of CI remain unknown in MELAS cells, which represent a challenge for the understanding of the pathophysiology of MELAS.

Here, to evaluate the metabolic part of carbohydrate reduction in ketogenic diet, MELAS cybrid cells was exposed to low glucose media (i.e. LG) over a period of 3 weeks demonstrating a significant improvement of complex I assembly and activity. Our study revealed an accumulation of CI matrix intermediates, which were significantly reduced after LG exposure, a process that alleviates complex I dysfunction in mutant cells.

2. Material and methods

2.1. Patient samples

Patient samples were taken after informed consent (IRB Committee of the University Hospital of Angers, Authorization number: AC-2012-1507). Post mortem brain tissue samples of a MELAS patient, a woman who died at 32 years of age and aged and gender matched control brain samples were taken and frozen immediately after death. Muscle tissues from MELAS patients and controls were taken after muscle biopsies.

2.2. Cell culture

The SH-SY5Y human parental neuroblastoma cell line was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC CRL-2266). Neuronal-like cybrid cells containing 97.2% of the m.3243A > G were generated as described elsewhere [17]. Parental and mutant cell lines were cultured at 37 °C in a humidified atmosphere (95% air; 5% CO₂) in high glucose (4.5 g/L) DMEM medium (PAN biotech, Aidenbach, Germany), supplemented with 10% SVF (PAN biotech), 1% glutamine (PAN biotech), 100 µg/ml sodium pyruvate and 50 µg/ml uridine (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA). Control fibroblasts were cultured in 2/3 DMEM F-12, 1/3 Amniomax (Gibco) medium supplemented with 10% SVF (PAN biotech), 100 µg/ml sodium pyruvate and 50 µg/ml uridine. Control and mutant cells were exposed to low glucose (0.5 g/l) culture in standard DMEM medium without supplementation of pyruvate. Cells were treated with 0.5 mM AICAR (5-aminoimidazole-4-carboxamide riboside) (Sigma Aldrich) during 48 h according to previous studies [37,38].

2.3. Quantification of mtDNA heteroplasmy and mtDNA copy number

The quantification of the mutant load was performed as described elsewhere [17]. To determine the mtDNA copy number in cells, quantitative PCR (Q-PCR) was performed by SYBR Green incorporation using the Chromo4 System (Biorad, California, USA). The mtDNA content was expressed as a ratio between the mean of the number of copies of two mitochondrial genes (ND4/COX1) and two nuclear genes (B2M/GAPDH). The pairs of selected primers were, respectively, ND4 (Forward: 5'-ACTCTCACTGCCAAGAAGACT-3' and Reverse: 5'-GTGTGAGGCGTATTATACCA-3') and COX1 (Forward: 5'-TACGTTGTAGCCAC TTCCACT-3' and Reverse: 5'-AGTAACGTCGGGGCATTCCG-3') for mtDNA genes and B2M (Forward: 5'-CAGCCTATTCTGCCAGCC-3' and Reverse: 5'-CAATGTTCTCCACATAGTGAGGG-3') and GAPDH

(Forward: 5'-CCCTGTCCAGTTAATTTTC-3' and Reverse 5'-CACCCCTTTAGGGGAGAAAAA) for the nuclear genes. Reactions were performed as follows: initial denaturation at 95 °C for 10 min, and 35 cycles at 95 °C for 30 s, 60 °C for 1 min (ND4/B2M), 57 °C for 1 min (COXI/GAPDH).

2.4. Mitochondrial enzyme activities

Cell pellets were resuspended in the following buffer (Saccharose 250 mM, Tris 20 mM, EDTA 2 mM, BSA 1 mg/mL, pH 7.4). After a freezing-thawing cycle, cells were centrifuged (16,000 g, 1 min) and washed once using the same buffer. For CI enzyme activities, 0.5 million of cells were sonicated then incubated at 37 °C in the medium composed of (KH₂PO₄ 100 mM, pH 7.4, KCN 1 mM, NaN₃ 2 mM, BSA 1 mg/ml, ubiquinone 0.1 mM and 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP) 0.075 mM). Enzyme measurement was started by adding 0.15 mM NADH and the disappearing rate of DCPIP was measured at 600 nm for 2 min. The unspecific activity was determined in the presence of rotenone (5 μM).

The enzymatic activity of complex I was normalized to citrate synthase activity, measured by adding 0.1 million of cells to a pre-warmed reaction mix composed of 5,5'-Dithiobis 2-nitrobenzoic acid (DTNB) 0.15 mM, oxaloacetic acid 0.5 mM, acetyl coA 0.3 mM, triton (×100 0.1%) and the rate of CoA-SH at 412 nm was assessed following the DTNB reduction.

2.5. Metabolites and NADH/NAD⁺ measurements

Glucose and lactate concentrations in the culture media were determined by spectrophotometry on a Hitachi-Roche apparatus (Roche Diagnostics, Bâle, Switzerland). Pyruvate concentrations were measured by spectrophotometry with a Pentra 400X (Horiba ABX, Kyoto, Japan). The NADH and NAD⁺ concentrations were measured as described elsewhere [39].

2.6. Oxygen consumption measurements

Oxygen consumptions were measured in intact MELAS cybrid cells using oxygraphic equipment (Oroboros, Innsbruck, Austria). The O₂ consumption was measured in routine respiration, and after complex V inhibition with oligomycin (1 mg/ml). The maximal respiration capacity was then measured by the successive additions of increasing doses of FCCP up to maximal respiration rate. The protein concentration was measured using the Lowry method.

2.7. Western Blot analysis

Frozen pellets of SH-SY5Y cells were resuspended in 1 × protease inhibitor cocktail (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Applied Science, Bale Switzerland). 50 μg of protein was added to a Laemmli sample buffer (277.8 mM Tris-HCL pH 6.8, 44.4% (v/v) glycerol, 4.4% LDS, 0.02% bromophenol blue, Bio Rad) supplemented with β-mercaptoethanol (10%), boiled for 5 min and loaded on 12.5% Tris-SDS-acrylamide gel. Proteins were separated by electrophoresis and transferred onto nitrocellulose membranes (BioRad). Membranes were blocked with a PBS 1 ×, Tween 0.01%, Blocking Buffer (LI-COR Odyssey, Lincoln, USA) solution for 2 h and incubated with primary antibodies Total OXPHOS Human WB Antibody Cocktail (1:1000 Abcam, Cambridge, UK), and TIM23 (Rabbit mAb, Abcam, 1:1000) overnight at 4 °C. Incubation with a secondary fluorescent antibody anti-mouse 680 nm (Alexa Fluor, Abcam, 1:10,000) and anti-rabbit 790 nm (Alexa Fluor, Abcam, 1:10,000) was performed for two hours at room temperature. Proteins were visualized by fluorescence detection on a LI-COR Odyssey apparatus. Proteins are quantified using ImageStudio software (Li-COR Odyssey). Tubulin antibody (Rabbit mAb, Abcam, 1:2000) was used as loading control.

2.8. BN-PAGE analysis

BN-PAGE experiments were adapted from [40]. Frozen pellets of SH-SY5Y cells were resuspended in 1 × PBS. Mitochondria were extracted by digitonin permeabilization (70 μg/10⁶ cells) and centrifugation (10,000 g, 10 min). The mitochondria-enriched pellet was treated with DNase (Qiagen, Hilden, Germany) (30 min at room temperature) and resuspended in the sample buffer (aminocaproic acid 1 M, bis Tris pH 7.0 50 mM, protease inhibitor cocktail 1 ×) and mixed with laurylmaltoside (2 g/g protein). The suspension was incubated during 10 min at 4 °C and centrifuged (20,000g for 20 min at 4 °C). Isolated mitochondrial proteins were loaded onto a 3–12% bis-acrylamide gradient gel (Novex, Invitrogen) and transferred onto PVDF membranes. Membranes were saturated for two hours using TBS 1 × (NaCl 0.8%, KCl 0.02%, Tris 0.3%, pH 7.4), Tween 0.01%, 10% non-fat milk and incubated with primary antibody raised against either CI matrix intermediates: NDUFS2 (Mouse mAb, Abcam, 1:1000), NDUFB6 (Mouse mAb, Abcam, 1:1000), NDUFAF4 (Rabbit mAb, Abcam, 1:1000), complex I membrane intermediates NDUFAF1 (Rabbit mAb, Abcam, 1:1000). Antibody against complex II (SDHA mouse mAb, Abcam 1:1000) was used as loading control. Membranes were then incubated with secondary anti-mouse and anti-rabbit antibodies (1:20,000, GE Healthcare, Little Chalfont, UK) and CI assembly was visualized by enhanced chemiluminescence using appropriate kit (Pierce) on a LI-COR Odyssey -Fc apparatus and quantified as described above (Western Blot analysis).

2.9. 2D-gel electrophoresis analysis

2D-gel electrophoresis experiments were adapted from [41]. First dimension was a BN-PAGE running in non-denaturing conditions. The second dimension was resolved by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes (GE Healthcare) and incubated with primary antibodies raised against NDUFS2 (Mouse mAb, Abcam, 1:1000) and NDUFB6 (Mouse mAb, Abcam, 1:1000). Membranes were incubated with secondary anti-mouse and anti-rabbit antibodies (1:20,000, GE Healthcare) and were visualized as described above (BN-PAGE analysis).

2.10. Mass spectrometry analysis

After BN-PAGE (see above), proteins were labelled with coomassie staining. Then, blots were cut and strips were washed (Ambic 25 mM and Ambic/CH₃CN), reduced (DTT), alkylated (iodoacetamide) and digested by trypsin over-night. After digestion, samples were sonicated for 3 min in the presence of 5 μL of buffer A (0.1% formic acid). Supernatants were used for NanoLC-MS/MS analysis (ESI Orbitrap Velos, ThermoFisher, Waltham, USA). Data collected from MS were blasted into Uniprot-Human data bank using MASCOT software. Peptides with a score > 30 (threshold corresponding to a *p*-value < 0.05) were analysed. Only proteins characterized with at least 2 identified peptides were kept for further analysis.

2.11. Statistical analysis

Data are presented as means ± SEM of at least 3 independent experiments. Differences between groups are evaluated by Mann-Whitney statistical test using GraphPad Prism software (GraphPad software, San Diego, USA), asterisk and the sharp sign (* and #) indicates *p*-value < 0.05, (** and ##) *p*-value < 0.001, (***) *p*-value < 0.0001.

3. Results

3.1. The accumulation of CI matrix intermediates is a hallmark of MELAS mutant cells

We assessed the CI assembly in control fibroblast (Ctrl), parental

Fig. 1. The MELAS cybrid cells have a severe impairment of CI assembly with an accumulation of matrix intermediates.

A1: BN-PAGE analysis of CI assembly of control fibroblasts (Ctrl), parental (P) and mutant (M) cybrid cells. The CI holoenzyme and assembly intermediates were visualized by enhanced chemiluminescence using NDUFB6 and NDUFS2 antibodies. Antibodies have been probed sequentially with NDUFB6 first and then NDUFS2. CII (SDHA) was used as loading control. **FA:** Fully Assembled, **A1:** Assembly Intermediates **A2:** Densitometric quantification of bands of fully-assembled holoenzyme and **(A3)** the percentage of CI assembly determined by the ratio of the relative quantity of $\approx 400/450$ KDa intermediates (white) to the relative quantity of fully-assembled holoenzyme (black). **B1:** BN-PAGE analysis of the relative quantity of CI matrix intermediates visualized by enhanced chemiluminescence using NDUFAF4. CII (SDHA) was used as loading control. **B2:** Densitometric quantification of bands of ≈ 250 and **(B3)** $\approx 400/450$ KDa matrix intermediates. **(C)** Two-dimensional gel electrophoresis of native mitochondrial proteins from Ctrl, P and M cells run on a BN-PAGE (1D) then separated with SDS-PAGE (2D). The holoenzyme complex and intermediates of CI assembly were visualized by enhanced chemiluminescence using NDUFS2 and NDUFB6 antibodies. CII (SDHA) was used as loading control. Blots of M cells have been overexposed in order to efficiently detect $\approx 400/450$ KDa assembly intermediates. **(D)** Nano LC/MS-MS analysis of proteins identified in $\approx 400/450$ KDa CI intermediates M cells, compared to P cells, revealed the presence of matrix CI subunits and the NDUFB10 membrane subunit. **(E)** Simplified graphical representation of CI assembly. According to [19] the ≈ 250 KDa intermediates correspond to the Q-module with the NDUFAF4 and NDUFAF3 assembly factors. The ≈ 400 KDa intermediates correspond to the Q/P_p-a module and the ≈ 830 KDa intermediates to the Q/P module. The Red hatched rectangles represent CI subunits targeted in BN- and SDS-PAGE experiments. The asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$).

SH-SY5Y cells (P) and nearly homoplasmic cybrids carrying 97.2% of mutation (M) by Blue-Native (BN) PAGE, using antibodies directed against NDUFB6 and NDUFS2, two nuclear-encoded CI subunits of the P- and Q-modules respectively, shown to be involved in the early phase of CI assembly (Fig. 1A1 and Fig. 1E). Control fibroblasts were used as control since mitochondria used to create the neuronal-like cybrid lines were originated from patient fibroblast cells. Western blotting analysis revealed a drastic reduction of the CI assembly in M cells characterized by a significant reduction of CI holoenzyme amount (90% compared to Ctrl and 85% compared to P) combined with an accumulation of CI assembly intermediates (Fig. 1A1-A3).

The CI assembly process was further analysed by BN-PAGE through a new approach using antibodies directed against NDUFAF4 and NDUFAF1, two CI assembly factors, which are chaperones involved in the stability and processing of CI assembly subunits and specifically binding to assembly intermediates [20]. Indeed, NDUFAF4 supports the anchor of the matrix intermediate of ≈ 250 KDa to the mitochondrial inner membrane allowing to monitor the processing of early CI matrix intermediates [42]. NDUFAF1 is an assembly factor involved in the early membrane arm formation allowing its detection [19,43]. These assembly factors support CI assembly until the addition of the N-module, and will be removed from the final structure of the holoenzyme, thus allowing a convenient monitoring of the assembly process (i.e from ≈ 250 KDa to ≈ 830 KDa intermediates) without interfering with the CI holoenzyme detection (Fig. 1B1, 1E and Fig. S1A) [19,44].

Our results revealed an accumulation of the different assembly intermediates in the M cells compared to Ctrl and P cells, highlighting a severe disruption of the CI assembly process (Fig. S1A-B). The $\approx 400/450$ KDa intermediate, referred as “matrix intermediates” in the following sections, was increased five-fold compared to P and Ctrl cells (Table S2 and Fig. 1B1 and 1B3). We also found a significant accumulation of the ≈ 830 KDa intermediate, referred as “the late intermediate”, (1.5-fold and 2.5-fold increase compared to P and Ctrl, respectively) (Table S2 and Fig. S1C). Nevertheless, we did not find a significant increase of the ≈ 250 KDa intermediate, referred as ‘early matrix arm’ in the next sections, in M cybrid cells compared to P and Ctrl cells (Table S2) (Fig. 1B1–B2). Furthermore, a severe CI assembly defect was also identified in patient tissues. Assembly intermediates of a muscle patient carrying 85% of the m.3243A > G mutation load revealed a drastic accumulation of the $\approx 400/450$ KDa intermediates (Fig. S1D). Hence, high mutant load of the m.3243A > G mutation is associated with a disturbance of CI assembly, characterized by a significant accumulation of matrix intermediates, although without affecting the formation of the early matrix arm.

To gain insights into the subunit composition of the matrix intermediates, a two-dimensional BN-PAGE/SDS-PAGE was performed using NDUFS2 and NDUFB6 antibodies, revealing both matrix and membrane arm assembly intermediates. As shown in Fig. 1C, both NDUFS2 and NDUFB6 subunits were detected within the CI holoenzyme of M, P and Ctrl cells. However, a specific accumulation of matrix intermediates in the mutant cells was revealed using NDUFS2 but not NDUFB6 (Fig. 1C). This result was reinforced by nano-LC/MS/MS analysis of

mitochondrial proteins extracted from BN-PAGE samples of P and M cells (Fig. 1D), showing the composition of the CI matrix arm with the presence of NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8, NDUFAF3 and NDUFB10-CI subunits, corresponding to the future Q-module, except for the accessory subunit NDUFB10 considered as a membrane arm subunit (Fig. 1D) [18,19]. Altogether, these results show that high mutation load leads to a severe defect of CI assembly, characterized by a significant accumulation of matrix arm intermediates, corresponding to the Q/P_p-a intermediate [19] (Table S2).

3.2. CI assembly defect is associated with a severe OXPHOS dysfunction

The assembly of CI holoenzyme is essential for its activity and for efficient OXPHOS functioning [44,45]. Hence, we assessed the CI NADH-Ubiquinone oxidoreductase (NUR) rotenone sensitive enzymatic activity and OXPHOS respiration rates of Ctrl, P and M cells. Our results showed a drastic reduction of 5.5-fold compared to Ctrl and 2.2-fold compared to P cells of the NUR activity in M cells (Fig. 2A), which was associated with a significant reduction of the respiration maximal capacity (3-fold compared to Ctrl and 3.7-fold compared to P cells) (Fig. 2B). Oxygen consumption measurements in intact M cells revealed a general reduction of the oxidative metabolism, with a significant decrease of the routine respiration (2.3-fold compared to Ctrl and 3.6-fold compared to P cells), combined with a reduction of the phosphorylative respiration (3.7-fold compared to Ctrl and 2.1-fold compared to P cells) (Fig. 2C and D). Moreover, the M cybrid cells consumed more glucose (1.5-fold compared to Ctrl and 1.7-fold compared to P), producing more lactate (2.4-fold compared to Ctrl and 1.7-fold compared to P) (Fig. 2E). The NADH/NAD⁺ ratio increased 6.5-fold compared to Ctrl and 3.4-fold compared to P cells, (Fig. 2F). Thus, the assembly defect of CI has drastic consequences on CI enzymatic activity and OXPHOS functions that ultimately are responsible for a metabolic switch toward glycolysis.

3.3. The analysis of MELAS brain and muscle tissues harboring high level of m.3243A > G mutation revealed a severe CI deficiency

To support the role of CI in MELAS pathophysiology, the assembly level of CI was performed on brain tissue from a MELAS patient carrying the m.3243A > G mutation. The mutant load was quantified reaching 92.1% of the MELAS mutation in brain. The BN-PAGE analysis of post mortem brain tissue from a patient revealed a drastic reduction of CI holoenzyme amount without any variation of the other complexes (Fig. 2G). Those results indicate that the m.3243A > G high mutation load mostly affect CI holoenzyme in brain tissue. Furthermore, patient brain displayed high mutant load and justified the use of SH-SY5Y neuronal cells harboring 97.2% mutant load.

Moreover, we have examined the relationships between heteroplasmy levels measured in the m.3243A > G patient's muscle and urine, and OXPHOS activities. Mitochondrial complex activities were determined on a series of muscle biopsies and showed that all patients carrying over 50% mutant load had a significant reduction of CI enzymatic activity (Table S1). Only P4 and P5 patient samples showed a

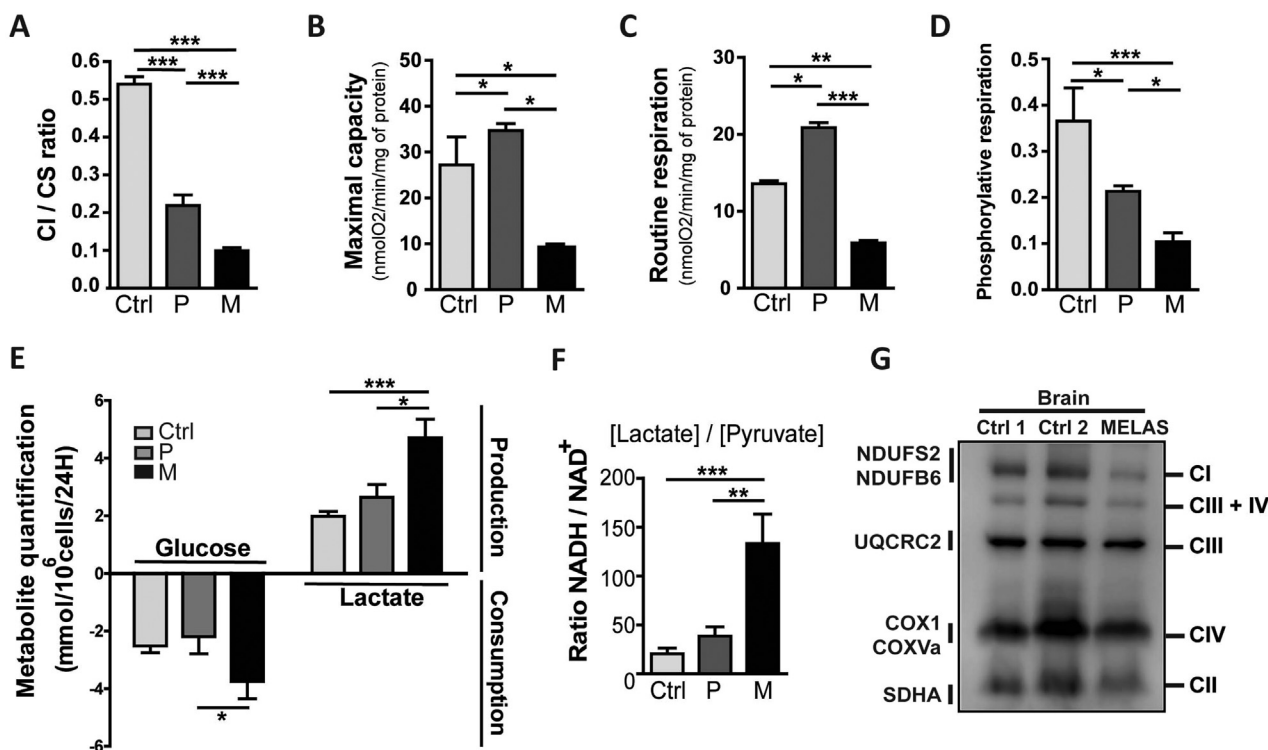


Fig. 2. The MELAS mutation is associated with a defect of CI enzymatic activity and oxidative metabolism.

(A) CI specific activity (NADH Ubiquinone Reductase activity relative to citrate synthase, CS) of Ctrl, P and M cells. (B)(C)(D) Respiration rates analysis in intact cells from Ctrl, P and M cells. (B) Maximal respiration capacity determined with FCCP titration. (C) Routine respiration. (D) Relative phosphorylative respiration to the ATP production, determined by the difference between routine and oligomycin respiration divided by the maximal capacity. (E) Glucose consumption, and lactate production in cell culture supernatant of Ctrl, P, and M cells. (F) Cytosolic NADH/NAD⁺ ratio was determined from the pyruvate/lactate concentration ratio. (G) Analysis of patient post mortem brain tissue carrying a high m.3243A > G mutation load is associated with a significant reduction of CI holoenzyme. BN-PAGE analysis of OXPHOS subunits of brain from two aged and gender matched controls (Ctrl1 and Ctrl2) and one m.3243A > G MELAS patient carrying 92.1% mutant load. OXPHOS subunits were respectively visualized by enhanced chemiluminescence using NDUFS2/NDUFB6 (CI), UQCRC2 (CIII) and COX1/COXVa (CIV). CII (SDHA) was used as loading control. Data are presented as mean \pm SEM of at least 4 independent experiments. Asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$), (**) ($p < 0.001$), (***) ($p < 0.0001$).

concomitant reduction of CIII and CIV enzymatic activities.

3.4. Glucose restriction restores CI assembly in MELAS cells

Next, we investigated if glucose restriction can restore oxidative metabolism in M cells. Parental and M cybrids were cultured in standard High Glucose (HG; 4.5 g/L) and Low Glucose media (LG; 0.5 g/L) during three weeks as shown in (Fig. 3A). In each experiment, results in LG were compared to results in HG media (i.e untreated cells).

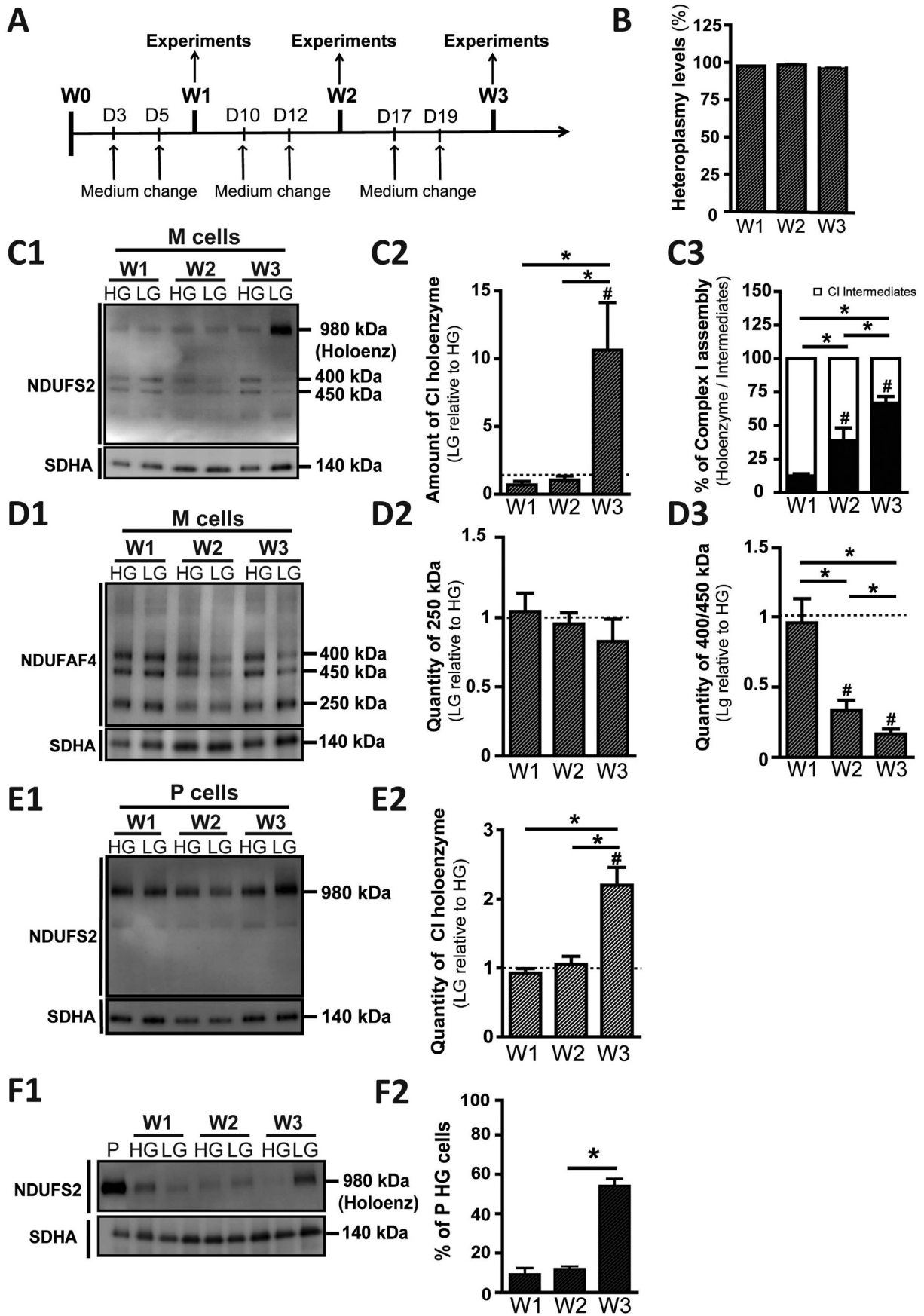
The quantification of the m.3243A > G mutation in M cybrids under LG treatment showed no significant variation of the mutant load during the 3 week exposure (Fig. 3B). The CI assembly in M cybrids cells was assessed and evidenced a significant CI assembly improvement (66% compared to untreated cells) (Fig. 3C1 and 3C3) with a 10-fold increase of total CI holoenzyme amount at W3 (Fig. 3C1–C2). The CI matrix intermediates were significantly reduced starting from week 2 (W2, 67% compared to untreated cells) to reach 83.4% at week 3 (W3) (Fig. 3C1, 3C3 and 3D3). This phenomenon was accompanied with an improvement of CI assembly process and a reduction of all assembly intermediates (29.5% compared to untreated cells) and a significant reduction of late intermediates (64% at W3 compared to untreated cells) (Fig. S2A–C). Nevertheless, restricting glucose concentration had no effect on the early stage of the assembly in M cells as seen with no significant variation of the \approx 250 kDa subunits (Fig. 3D1–D2). In P cells the quantity of fully assembled CI holoenzyme was significantly increased at W3 (Fig. 3E1 and E2). Finally, comparing to the P cells in standard medium, the level of CI holoenzyme for M cells at W3 reached 55% of the level of P cells (Fig. 3F1 and F2). Thus, we demonstrated that long term reduction of glucose concentration significantly

improves CI assembly by decreasing the accumulation of matrix intermediates as early as W2, to drastically increase CI holoenzyme at W3 in MELAS M cells.

3.5. Glucose restriction improves OXPHOS functions in MELAS cells

As CI assembly is intricately linked to OXPHOS functionality, we assessed the CI enzymatic activity and respiration rates during the 3 weeks of limiting glucose in cell culture. First, CI enzymatic activity was improved with a 45.2% and 52.7% at W2 and W3 respectively in M cells (Fig. 4A). Surprisingly, after the first week of LG exposure, we found an unexpected significant 38% reduction of CI enzymatic activity (Fig. 4A). Nevertheless, CI enzymatic activity improvement at W2 was accompanied by a 1.5-fold increase of OXPHOS maximal capacity, reaching a 2-fold increase at W3 (Fig. 4B). Furthermore, we observed a striking improvement of oxidative metabolism of M cells, as early as W2 with a significant increase of routine (1.9-fold compared to untreated cells) and phosphorylative (2.5-fold change compared to untreated cells) respiration. These parameters reached a maximum at W3, with a 2.2-fold and a 5.8-fold changes increased routine and phosphorylative respirations respectively (Fig. 4C and D). Again, in line with the CI enzymatic activity at W1, a significant reduction (14%) of the routine respiration was identified, but not of the phosphorylative respiration (Fig. 4C and D).

Hence, long-term glucose restriction significantly improved CI assembly and the quantity of holoenzyme in M cells, leading to a significant increase of oxidative metabolism. Conversely looking at parental cells, the relative amount of CI holoenzyme was increased with a significant 2.2-fold change at W3 compared to untreated cells (Fig. 3E1



(caption on next page)

Fig. 3. Low glucose (LG) exposure improves CI assembly.

(A) Schematic timeline of the experimental protocol. (B) Quantification of the mutation load in M cells during 3 weeks of glucose restriction (C1) BN-PAGE analysis of CI assembly of M cybrid cells exposed to LG during 3 weeks (W1 to W3) compared to standard High Glucose (HG) medium. The CI holoenzyme and intermediates were visualized by enhanced chemiluminescence using NDUFS2 antibody. CII was used as loading control. (C2) Densitometric quantification of LG versus HG immunoblot signals of fully-assembled holoenzyme of M cells and (C3) the percentage of CI assembly intermediates determined by the ratio of the relative quantity of $\approx 400/450$ KDa (white) and the fully-assembled holoenzyme (black). (D1) BN-PAGE analysis of CI assembly of M cells exposed to LG during 3 weeks compared to HG, CI matrix intermediates were visualized by enhanced chemiluminescence using NDUFAF4. CII (SDHA) was used as loading control. (D2) Densitometric quantification of LG versus HG immunoblot signals of ≈ 250 KDa and (D3) $\approx 400/450$ KDa matrix intermediates. (E1) BN-PAGE analysis of CI assembly of P cells exposed to LG during 3 weeks compared to HG. (E2) Densitometry quantification of CI fully-assembled holoenzyme in P cells. Results are expressed as fold changes relative to HG M cybrid cells. (F1) Comparison of CI assembly for M cells during the 3 weeks of LG exposure relative to P cells in HG at W1, visualized by enhanced chemiluminescence using NDUFS2 antibody. CII was used as loading control. (F2) Densitometric quantification of immunoblot signals of fully-assembled holoenzyme of M cells in LG compared to P cells in HG.

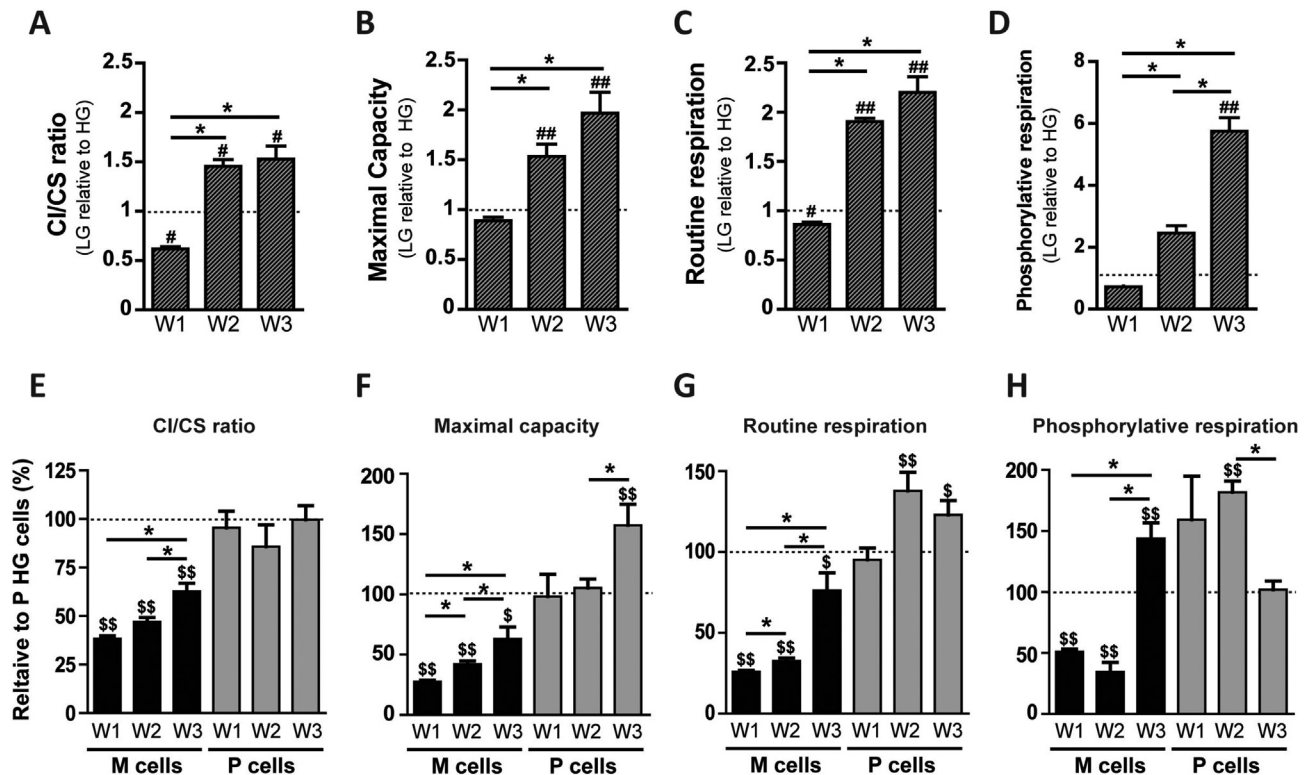
Data are presented as mean \pm SEM of at least 3 independent experiments. Asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$). Statistical differences between HG and LG cells, after each week of exposure, the sharp sign (#) indicates significant differences ($p < 0.05$).

and E2). However, limiting glucose concentration did not modify the CI/CS ratio but increased the maximal respiration capacity of the P cells at W3 of LG exposure (Fig. 4E and F) and the routine respiration at W2 and W3 whereas the phosphorylative respiration level of P cells was significantly reduced from W2 to W3 (Fig. 4G–H).

3.6. Glucose restriction increases OXPHOS protein expression and mtDNA copy number in mutant cells

As we evidenced a significant increase of CI holoenzyme in both P and M cybrids, to assess the role of LG in mitochondrial biogenesis, mtDNA copy number and relative quantities of subunits of the five OXPHOS complexes were followed during 3 weeks of LG exposure. A progressive increase of mtDNA copy number from W1 (1.45 fold-change compared to untreated cells) to W3 (2.3 fold-change) was

revealed in M cells (Fig. 5A) whereas no significant changes were seen in P cells (Fig. 5B). Interestingly, a significant reduction of 50% of NDUFB8 protein expression (18 KDa) was observed at W1 while this parameter increased 1.5-fold at W3, compared to untreated cells (Fig. 5C–D). In addition, OXPHOS subunits from other complexes were significantly increased at W3 in LG media (CII: 187%; CIII: 175%; CIV: 151%; CV: 146%). These increases were specifically observed at W3, but not at W1 and W2, except for the CII SDHB subunit, which was 1.5-fold increased at W2 (Fig. 5C–D). Therefore, LG exposure increased mtDNA copy number all along the three weeks of exposure, with the accumulation of OXPHOS complex subunits at W3 highlighting the role of mitochondrial biogenesis in M cells. A significant increase of selected OXPHOS proteins such as CI and CII subunits and also the expression level of TIM23 was seen in P cells (Fig. 5E–F). Compared to the expression levels of mitochondrial proteins in P cells in standard medium,

**Fig. 4.** Low Glucose improves CI enzymatic activity and oxidative metabolism in MELAS cells.

(A) CI specific activity (NUR activity relative to citrate synthase) of M cybrid cells during 3 weeks of LG exposure, relative to untreated cells. (B)(C)(D) Analysis of respiration rates of M cells during 3 weeks of LG exposure, relative to untreated mutant cells. Results are expressed as fold changes relative to untreated M cybrid cells. (E) CI specific activity relative to citrate synthase of M and P cells during 3 weeks of LG exposure. Results are expressed as fold changes relative to untreated P cells in HG medium. (F)(G)(H) Analysis of respiration rates of M and P cells during 3 weeks of LG exposure, relative to untreated P cells in HG medium. (B)(F) Maximal respiration capacity determined with FCCP titration. (C)(G) Routine respiration rates. (D)(H) Relative phosphorylating respiration.

Data are presented as mean \pm SEM of at least 3 independent experiments. Asterisk (*) indicates significant differences ($p < 0.05$). Statistical differences between LG treated and untreated cells, after each week of LG exposure are indicated with a sharp sign (#) with ($p < 0.05$), or (##) ($p < 0.001$). Statistical differences between M or P cells compared to P HG cells are indicated with (\$) for ($p < 0.05$), or (\$\$) for ($p < 0.001$).

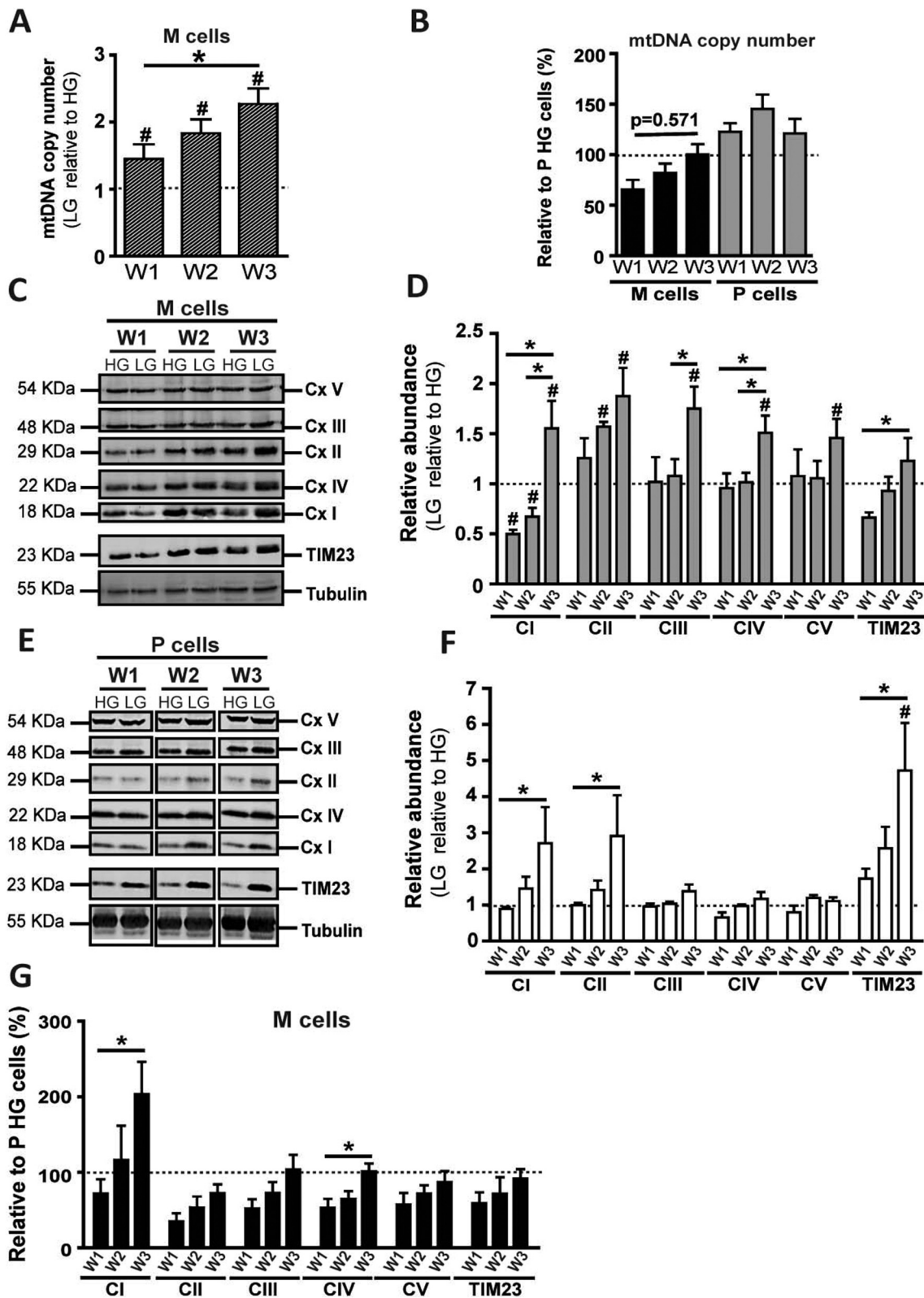


Fig. 5. Low Glucose increases mitochondrial biogenesis in MELAS cells.

(A) Quantification of the mtDNA copy number of M cybrid cells during the 3 weeks of LG exposure, relative to untreated cells. (B) Comparison of the mtDNA copy number for M and P cells during the 3 weeks of LG exposure relative to parental cells in HG. (C) Western-Blot analysis of OXPHOS subunits of M cybrid cells during the 3 weeks of LG exposure compared to untreated cells. (D) Densitometric quantification of LG versus HG immunoblot bands for M cells. (E) Western-Blot analysis of OXPHOS subunits of P cells during the 3 weeks of LG exposure compared to untreated cells. (F) Densitometric quantification of LG versus HG immunoblot bands for P cells. Tubulin was used as a mitochondrial mass marker. (G) Comparison of OXPHOS subunit expression for M cells during the 3 weeks of LG exposure related to P cells in HG. Data are presented as means \pm SEM of 4 independent experiments. Statistical differences are indicated with an asterisk (*) and ($p < 0.05$), the sharp sign (#) indicates significant differences ($p < 0.05$) between HG and LG cells, during the 3 weeks of exposure.

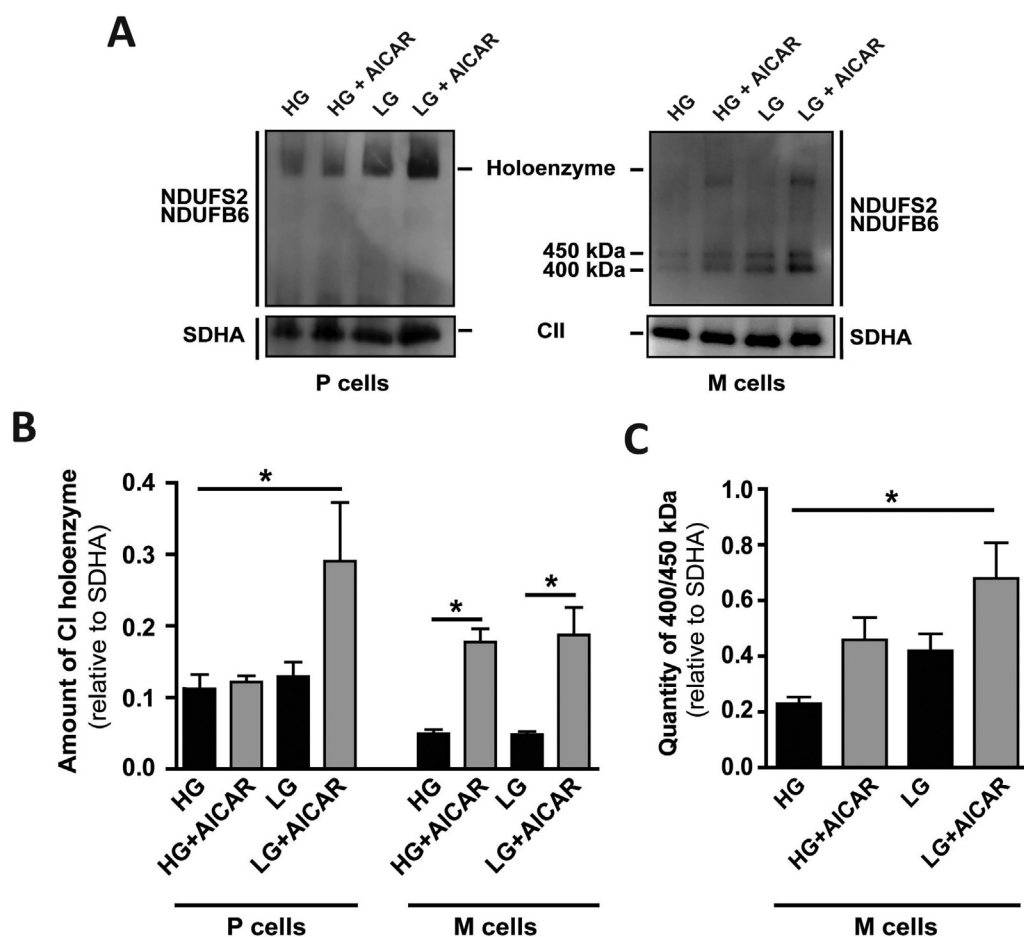


Fig. 6. AICAR treatment ameliorates CI assembly in MELAS cells.

(A) BN-PAGE analysis of CI assembly of parental (P) and mutant (M) cells after 48 h of AICAR exposure. High Glucose (HG) or Low Glucose (LG) \pm 0.5 mM AICAR. CI holoenzyme and matrix intermediates were visualized by enhanced chemiluminescence using NDUFS2 and NDUFB6 subunits. CII (SDHA) was used as loading control. (B) Densitometric immunoblot band quantification of LG versus HG treated or untreated with 0.5 mM AICAR during 48 h of fully-assembled holoenzyme and (C) the percentage of CI assembly intermediates of \approx 400/450 kDa relative to SDHA. Data are presented as means \pm SEM of 4 independent experiments. Statistical differences are indicated with an asterisk (*) and ($p < 0.05$), with significant differences ($p < 0.05$) between AICAR treated vs untreated mutant or parental cells.

CI and CIV complexes appeared as the two main OXPHOS complexes modulated through LG in M cells (Fig. 5G).

3.7. AICAR treatment ameliorates CI assembly in MELAS cells

Since mitochondrial biogenesis appears as a main mechanism during LG exposure, mutant cells were exposed to AICAR known to increase mitochondrial biogenesis through the activation of AMPK pathway [37,38]. The analysis revealed more than a 3-fold increase of CI holoenzyme in M cells after 48 h of AICAR exposure in HG or LG media (Fig. 6A-B). In parallel, the CI assembly intermediates of 400/450 kDa were also significantly increased compared to untreated cells (Fig. 6A and C). We also showed a significant 2-fold increase of CI holoenzyme in parental cells after 48 h of AICAR treatment but only when AICAR was combined with glucose restriction (Fig. 6A-B).

4. Discussion

Ketogenic diet (KD) has been proposed to treat pharmaco-resistant epilepsies for decades but emerging data suggest that this diet could be also helpful to treat a large variety of disorders including MELAS syndrome [33]. There are different types of KD but they are all in common a significant reduction of carbohydrates [47]. The broad success of KD is probably due to multiple beneficial mechanisms linked to combined effects of low carbohydrate intake and ketone bodies [48]. To evaluate the metabolic part of carbohydrate reduction in the KD, trans-mitochondrial MELAS cybrid cells, shown to be associated with a severe complex I assembly defect were exposed over a period of 3 weeks to LG medium. The LG exposure after 3 weeks demonstrated a significant improvement of complex I assembly, drastically reducing the matrix

arm assembly intermediates and restoring complex I activity.

So far only few MELAS patients have been treated with KD in an empirical way in our clinics or as described in [33] with apparent clinical improvement. But still a better understanding of the mechanisms and evaluation of the efficacy of the KD with a scientific rationale are warranted to consider moving further and envision future clinical trials. Interestingly, a clinical trial was completed focusing on the evaluation of the ability of ketosis to shift mtDNA heteroplasmy in subjects harboring the MELAS mutation at position m.3243A > G. Subjects were given supplemental medium chain triglycerides (MCTs) for a period of 6 months. The mtDNA mutant load was then measured 3 months prior to treatment, at treatment initiation, and 6 months after initiation (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT01252979). However, the mutant load considered as the primary outcome of the clinical trial was unchanged in MELAS patients treated with MCTs (Dr M Koenig, personal communication). In our study, the exposure of 3 weeks with LG also did not change the mutant load but increased the mtDNA copy number similar to our previous study exposing mutant MELAS cells to ketone bodies [34]. Therefore, even if the proportion of mutant did not change, the significant increase of wild-type copies due to a global increase of mtDNA copy number could have beneficial effects in MELAS cells.

At the molecular point of view, it is currently well known that the m.3243A > G mutation affects the tRNA^{Leu(UUR)} wobble base maturation leading to a reduction of stability and aminoacylation of the tRNA^{Leu(UUR)} [7,14,49]. This primary defect is responsible for a decrease of mitochondrial translation fidelity and efficiency, causing a reduction of mitochondrial protein synthesis proportionally to the mutant load, as previously described in an osteosarcoma 143B cybrids [7,14,49]. Here, we confirmed that these defects are responsible for

OXPHOS dysfunction, with a severe CI activity deficiency, while less was known about the consequences of the MELAS mutation on CI assembly. Our study revealed a clear disturbance of the CI assembly process and the accumulation of CI assembly intermediates, which were of matrix origin, as revealed by BN-PAGE/SDS and mass spectrometry analysis.

Interestingly enough, CI assembly defect was recapitulated in MELAS patient tissues such as brain or skeletal muscle using BN-PAGE analysis with a significant reduction of CI holoenzyme and the presence of CI assembly intermediates. Together the CI assembly defect is responsible for a severe impairment of oxidative metabolism and a metabolic switch toward glycolysis, which contributes to severe lactic acidosis observed in MELAS patients [12].

The reason why CI is significantly affected in MELAS cells is maybe due to the number of mitochondrially-encoded subunits but also due to the proportion of leucine^(UUR) in these subunits. Synthesis of the seven CI ND subunits encoded by the mitochondrial genome is severely altered in cybrids carrying high mutation load [50–52]. It also has been hypothesized that the CI deficiency observed in MELAS patients results from a specific UUG-codon translational defect together with the incorporation of alternate amino-acids inducing a reduction of mitochondrial encoded protein quantity and stability [7,52]. Indeed, the ND6 protein which has the largest proportion of leucine encoded by the UUG codon is consistently affected by the m.3243A > G mutation [7]. Together with other ND subunits, the assembly of the membrane arm into the inner mitochondrial membrane might be compromised, preventing further assembly with the Q-module to form a fully active CI [15,16]. However, CI assembly is not completely abolished, as we evidenced the presence of residual CI holoenzyme proportionally to the heteroplasmy level [17]. Thus, in MELAS, the reduced CI holoenzyme amount would directly result from the level of heteroplasmy, due to a restricted ability to translate ND subunits. It is interesting to note that MELAS syndrome is mainly due to tRNA mutations affecting protein synthesis but several pathogenic variants of ND genes mainly MT-ND5 and also MT-ND1 and MT-ND6 have been associated with MELAS syndrome, emphasizing the role of complex I in the pathophysiology of MELAS [8]. As a consequence, this in turn will lead to a stoichiometric imbalance between the limiting mitochondrial membrane subunits and the normal amounts of the nuclear-encoded matrix subunits. Thus, targeting CI assembly and stability should be a way to promote an efficient oxidative metabolism in MELAS syndrome. Undoubtedly, other complexes such as complex IV have also to be considered as it contributes to the pathophysiology of MELAS syndrome.

Attention has focused on the use of diets and their efficacy in controlling metabolic and mitochondrial diseases. Dietary restriction has been shown to expand the lifespan of a wide variety of species and reduces the incidence of major age-related diseases [53]. In addition, such dietary approaches have shown beneficial effects on mitochondrial biogenesis and functions [54,55]. Among them, calorie restriction is clearly recognized to increase longevity and health span, by acting positively on several pathways including OXPHOS efficiency and mitochondrial turn-over [54]. Interestingly, here after 3 weeks of LG exposure, we have shown a significant improvement of CI assembly in MELAS cells with a striking progressive increase of the holoenzyme amount, combined with a significant reduction of the accumulation of matrix intermediates. This latter process was already evidenced at W2, although without a significant increase of the CI holoenzyme amount. Furthermore, during the two first weeks of low glucose exposure, we observed a significant reduction of the nuclear-encoded NDUFB8 CI subunit, without any variation of other OXPHOS subunits except that of SDHB (CII), suggesting that the intermediate forms are preferentially eliminated than integrated in newly assembled CI holoenzyme. Nevertheless, further investigations must be conducted to understand the mechanisms underlying the elimination of matrix intermediates, as their accumulations are deleterious for mitochondrial homeostasis and functions. Interestingly enough, it was previously shown that the

accumulation of CI matrix arm assembly intermediates was associated with a reduction of longevity in mouse models [45]. This study strongly suggest that optimal CI assembly without accumulation of CI matrix intermediates is linked to increased longevity in mice through 2 main mechanisms, increasing the efficiency of substrate utilization, and a reduction of ROS overproduction [45]. We have also recently shown that CI assembly defects are directly linked to ROS overproduction and to the severity of CI disease [46]. Mutant cells carrying nuclear-encoded mutations of the CI matrix arm, targeting the Q or N modules, showed a CI disassembly with the accumulation of an unconnected N module but still active and responsible for ROS overproduction [46]. In our study, a partial restoration of CI enzymatic activity and OXPHOS functions was observed starting from the second week of glucose restriction, corresponding to the reduction of matrix intermediates, but without at that time, a significant increase of CI holoenzyme amount.

Moreover, the reduction of matrix intermediates is followed by a striking increase of CI holoenzyme amount at W3 together with a significant increase of mtDNA copy number and OXPHOS complexes. We also found a similar 2-fold increase of CI holoenzyme in the P cells after 3 weeks of glucose restriction. This is in line with an induction of mitochondrial biogenesis as already seen in drosophila model where low carbohydrate intake led to an overall increase of OXPHOS enzyme subunits [53]. Thus, glucose restriction reduced progressively in a sequential way, the accumulation of toxic matrix intermediates and more importantly increased CI holoenzyme amount, promoting a significant improvement of oxidative metabolism and mitochondrial biogenesis.

Recent studies have highlighted the role of AICAR in stimulating mitochondrial biogenesis in CI related diseases and MELAS syndrome [37,38] AICAR is known as a pharmacological activator of the AMP activated protein kinase (AMPK) pathway [56–58]. Since mitochondrial biogenesis appeared as an important mechanism in glucose restriction, MELAS mutant cells were exposed to AICAR during 48 h. The relative expression of CI holoenzyme was increased more than 3-fold compared to untreated cells. Interestingly, in parallel the amount of CI assembly intermediates of $\approx 400/450$ kDa was significantly increased, indicating that other mechanisms were maybe involved in the CI assembly process. It has been shown that AMPK regulates mitochondrial biogenesis but also mitochondrial degradation through the mitophagic process as a critical and fine balance between both mechanisms in MELAS cells [37]. Additional experiments including exposing mutant cells to AICAR for a longer period of time will be required to determine the activation of mitochondrial biogenesis and its potential role in improving the CI assembly and to determine the mechanisms responsible for the elimination of mitochondrial assembly intermediates.

Chronic exposure of KD has been also a matter of debate. Safety and tolerability of KD have already been evaluated in several clinical trials for intractable seizures [32,59]. Long-term exposure of very low carbohydrate KD in mice during 80 weeks demonstrated that the diet was well tolerated without adverse events on normal longevity [60].

5. Conclusions

Our study revealed the importance of CI assembly but a better understanding of the mechanisms underlying the accumulation of matrix intermediates is mandatory to well understand the pathophysiology of MELAS syndrome. As shown, LG exposure has promising physiological effects on a neuronal-like model of MELAS, by improving CI assembly and oxidative metabolism. Thus, this metabolic approach should be challenged in other mitochondrial disease models, as well as in other disorders involving the accumulation of OXPHOS assembly intermediates. In addition, we should gain further insights into the mechanisms related to carbohydrate reduction in order to identify alternative pharmacological approaches prompting CI re-assembly with the use of promising drugs such as AICAR. This should lead to novel therapeutic routes to efficiently treat MELAS patients.

Supplementary data to this article can be found online at <https://>

doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.02.005.

Transparency document

The <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2018.02.005> associated with this article can be found, in online version.

Acknowledgments

This work was supported by grants from: “Fondation pour la Recherche Médicale” DPM20121125554, “Association Française contre les Myopathies” Mitoscreen 17122, “Région Pays de la Loire”, “Association contre les Maladies Mitochondriales” and supports from the University and Hospital of Angers.

Conflict of interest statement

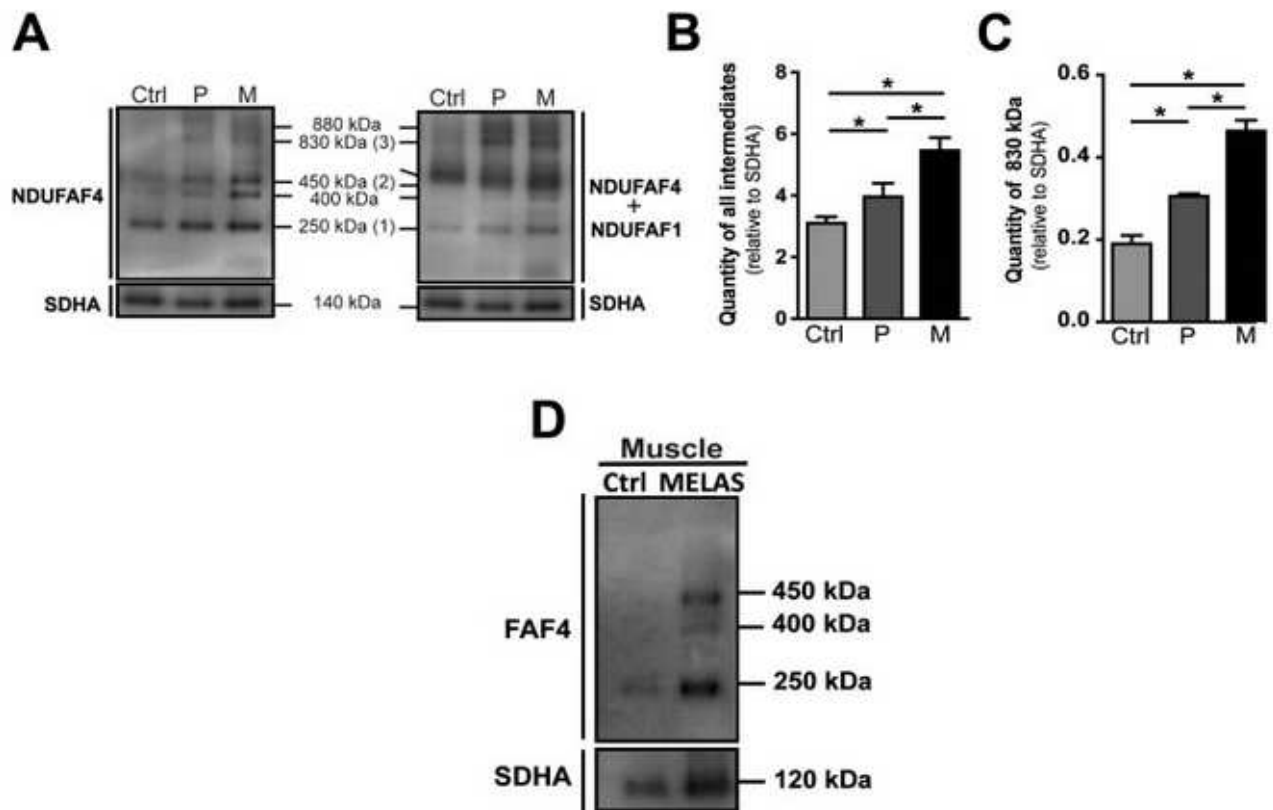
None declared.

References

- D.C. Wallace, W. Fan, V. Procaccio, Mitochondrial energetics and therapeutics, *Annu. Rev. Pathol.* 5 (2010) 297–348.
- D.C. Wallace, A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine, *Annu. Rev. Genet.* 39 (2005) 359–407.
- D.C. Wallace, Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine, *Annu. Rev. Biochem.* 76 (2007) 781–821.
- Y. Goto, I. Nonaka, S. Horai, A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies, *Nature* 348 (1990) 651–653.
- J. Uusimaa, J.S. Moilanen, L. Vainionpää, P. Tapanainen, P. Lindholm, M. Nuutinen, T. Löppönen, E. Mäki-Torkko, H. Rantala, K. Majamaa, Prevalence, segregation, and phenotype of the mitochondrial DNA 3243A > G mutation in children, *Ann. Neurol.* 62 (2007) 278–287.
- A. Chomyn, A. Martinuzzi, M. Yoneda, A. Daga, O. Hurko, D. Johns, S.T. Lai, I. Nonaka, C. Angelini, G. Attardi, MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 4221–4225.
- Y. Kirino, T. Yasukawa, S. Ohta, S. Akira, K. Ishihara, K. Watanabe, T. Suzuki, Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 15070–15075.
- S. DiMauro, M. Hirano, MELAS, in: R.A. Pagon, M.P. Adam, H.H. Ardinger, S.E. Wallace, A. Amemiya, L.J. Bean, T.D. Bird, N. Ledbetter, H.C. Mefford, R.J. Smith, et al. (Eds.), *GeneReviews*(®), University of Washington, Seattle, Seattle (WA), 1993.
- S. Shanske, J. Coku, J. Lu, J. Ganesh, S. Krishna, K. Tanji, E. Bonilla, A.B. Naini, M. Hirano, S. DiMauro, The G13513A mutation in the ND5 gene of mitochondrial DNA as a common cause of MELAS or Leigh syndrome: evidence from 12 cases, *Arch. Neurol.* 65 (2008) 368–372.
- A.W. El-Hattab, A.M. Adesina, J. Jones, F. Scaglia, MELAS syndrome: clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options, *Mol. Genet. Metab.* 116 (2015) 4–12.
- D.M. Sproule, P. Kaufmann, Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: basic concepts, clinical phenotype, and therapeutic management of MELAS syndrome, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1142 (2008) 133–158.
- J. Finsterer, Genetic, pathogenetic, and phenotypic implications of the mitochondrial A3243G tRNA(Leu)(UUR) mutation, *Acta Neurol. Scand.* 116 (2007) 1–14.
- W.J.H. Koopman, P.H.G.M. Willems, J.A.M. Smeitink, Monogenic mitochondrial disorders, *N. Engl. J. Med.* 366 (2012) 1132–1141.
- D.R. Dunbar, P.A. Moonie, M. Zeviani, L.J. Holt, Complex I deficiency is associated with 3243G:C mitochondrial DNA in osteosarcoma cell hybrids, *Hum. Mol. Genet.* 5 (1996) 123–129.
- K. Majamaa, H. Rusanen, A. Remes, I.E. Hassinen, Metabolic interventions against complex I deficiency in MELAS syndrome, *Mol. Cell. Biochem.* 174 (1997) 291–296.
- R.H. Hämläinen, T. Manninen, H. Koivumäki, M. Kislin, T. Otonkoski, A. Suomalainen, Tissue- and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A > G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110 (2013) E3622–E3630.
- V. Desquiret-Dumas, N. Gueguen, M. Barth, A. Chevrollier, S. Hancock, D.C. Wallace, P. Amati-Bonneau, D. Henrion, D. Bonneau, P. Reynier, et al., Metabolically induced heteroplasmic shifting and l-arginine treatment reduce the energetic defect in a neuronal-like model of MELAS, *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (2012) 1019–1029.
- L. Sánchez-Caballero, S. Guerrero-Castillo, L. Nijtmans, Unraveling the complexity of mitochondrial complex I assembly: a dynamic process, *Biochim. Biophys. Acta* 1857 (2016) 980–990.
- S. Guerrero-Castillo, F. Baertling, D. Kownatzki, H.J. Wessels, S. Arnold, U. Brandt, L. Nijtmans, The assembly pathway of mitochondrial respiratory chain complex I, *Cell Metab.* 25 (2017) 128–139.
- M. Mimaki, X. Wang, M. McKenzie, D.R. Thorburn, M.T. Ryan, Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1817 (2012) 851–862.
- J. Carroll, I.M. Fearnley, J.M. Skehel, R.J. Shannon, J. Hirst, J.E. Walker, Bovine complex I is a complex of 45 different subunits, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 32724–32727.
- T. Friedrich, B. Böttcher, The gross structure of the respiratory complex I: a Lego system, *Biochim. Biophys. Acta* 1608 (2004) 1–9.
- J. Carroll, I.M. Fearnley, R.J. Shannon, J. Hirst, J.E. Walker, Analysis of the subunit composition of complex I from bovine heart mitochondria, *Mol. Cell. Proteomics* MCP 2 (2003) 117–126.
- L.A. Sazanov, P. Hinchliffe, Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*, *Science* 311 (2006) 1430–1436.
- M. Lazarou, M. McKenzie, A. Ohtake, D.R. Thorburn, M.T. Ryan, Analysis of the assembly profiles for mitochondrial- and nuclear-DNA-encoded subunits into complex I, *Mol. Cell. Biol.* 27 (2007) 4228–4237.
- D.M. Kirby, M. Crawford, M.A. Cleary, H.H. Dahl, X. Dennett, D.R. Thorburn, Respiratory chain complex I deficiency: an underdiagnosed energy generation disorder, *Neurology* 52 (1999) 1255–1264.
- R.H. Triepels, L.P. Van Den Heuvel, J.M. Trijbels, J.A. Smeitink, Respiratory chain complex I deficiency, *Am. J. Med. Genet.* 106 (2001) 37–45.
- F. Distelmaier, W.J.H. Koopman, L.P. van den Heuvel, R.J. Rodenburg, E. Mayatepek, P.H.G.M. Willems, J.A.M. Smeitink, Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease, *Brain J. Neurol.* 132 (2009) 833–842.
- B.H. Robinson, L. De Meirleir, M. Glerum, G. Sherwood, L. Becker, Clinical presentation of mitochondrial respiratory chain defects in NADH-coenzyme Q reductase and cytochrome oxidase: clues to pathogenesis of Leigh disease, *J. Pediatr.* 110 (1987) 216–222.
- J.L. Loeffen, J.A. Smeitink, J.M. Trijbels, A.J. Janssen, R.H. Triepels, R.C. Sengers, L.P. van den Heuvel, Isolated complex I deficiency in children: clinical, biochemical and genetic aspects, *Hum. Mutat.* 15 (2000) 123–134.
- Y. Koga, N. Povalko, J. Nishioka, K. Katayama, S. Yatsuga, T. Matsui, Molecular pathology of MELAS and L-arginine effects, *Biochim. Biophys. Acta* 1820 (2012) 608–614.
- H.-C. Kang, Y.-M. Lee, H.D. Kim, Mitochondrial disease and epilepsy, *Brain and Development* 35 (2013) 757–761.
- C. Steriade, D.M. Andrade, H. Faghfoury, M.A. Tarnopolsky, P. Tai, Mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) may respond to adjunctive ketogenic diet, *Pediatr. Neurol.* 50 (2014) 498–502.
- S. Frey, G. Geffroy, V. Desquiret-Dumas, N. Gueguen, C. Bris, S. Belal, P. Amati-Bonneau, A. Chevrollier, M. Barth, D. Henrion, et al., The addition of ketone bodies alleviates mitochondrial dysfunction by restoring complex I assembly in a MELAS cellular model, *Biochim. Biophys. Acta* 1863 (2017) 284–291.
- K.J. Bough, J.M. Rho, Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet, *Epilepsia* 48 (2007) 43–58.
- F. Sasarman, H. Antonicka, E.A. Shoubridge, The A3243G tRNA(Leu)(UUR) MELAS mutation causes amino acid misincorporation and a combined respiratory chain assembly defect partially suppressed by overexpression of EFTu and EFG2, *Hum. Mol. Genet.* 17 (2008) 3697–3707.
- J. Garrido-Maraver, M.V. Paz, M.D. Cordero, J. Bautista-Lorite, M. Oropesa-Ávila, M. de la Mata, A.D. Pavón, I. de Laveria, E. Alcocer-Gómez, F. Galán, et al., Critical role of AMP-activated protein kinase in the balance between mitophagy and mitochondrial biogenesis in MELAS disease, *Biochim. Biophys. Acta* 1852 (2015) 2535–2553.
- A. Golubitzky, P. Dan, S. Weissman, G. Link, J.D. Wikstrom, A. Saada, Screening for active small molecules in mitochondrial complex I deficient patient's fibroblasts, reveals AICAR as the most beneficial compound, *PLoS One* 6 (2011) e26883.
- V. Desquiret-Dumas, N. Gueguen, G. Leman, S. Baron, V. Nivet-Antoine, S. Chupin, A. Chevrollier, E. Vessières, A. Ayer, M. Ferré, et al., Resveratrol induces a mitochondrial complex I-dependent increase in NADH oxidation responsible for sirtuin activation in liver cells, *J. Biol. Chem.* 288 (2013) 36662–36675.
- H. Schagger, Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes, *Methods Enzymol.* 260 (1995) 190–202.
- H. Schagger, H. Bentlage, W. Ruitenbeek, K. Pfeiffer, S. Rotter, C. Rother, A. Böttcher-Purk, E. Lodemann, Electrophoretic separation of multiprotein complexes from blood platelets and cell lines: technique for the analysis of diseases with defects in oxidative phosphorylation, *Electrophoresis* 17 (1996) 709–714.
- A. Saada, S. Edvardson, M. Rapoport, A. Shaag, K. Amry, C. Miller, H. Lorberboum-Galski, O. Elpeleg, C6ORF66 is an assembly factor of mitochondrial complex I, *Am. J. Hum. Genet.* 82 (2008) 32–38.
- C.J.R. Dunning, M. McKenzie, C. Sugiana, M. Lazarou, J. Silke, A. Connelly, J.M. Fletcher, D.M. Kirby, D.R. Thorburn, M.T. Ryan, Human CIA30 is involved in the early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease, *EMBO J.* 26 (2007) 3227–3237.
- J. Nouws, L.G.J. Nijtmans, J.A. Smeitink, R.O. Vogel, Assembly factors as a new class of disease genes for mitochondrial complex I deficiency: cause, pathology and treatment options, *Brain J. Neurol.* 135 (2012) 12–22.
- S. Miwa, H. Jow, K. Baty, A. Johnson, R. Czapiewski, G. Saretzki, A. Treumann, T. von Zglinicki, Low abundance of the matrix arm of complex I in mitochondria predicts longevity in mice, *Nat. Commun.* 5 (2014) 3837.
- G. Leman, N. Gueguen, V. Desquiret-Dumas, M.S. Kane, C. Wetterwald, S. Chupin, A. Chevrollier, A.-S. Lebre, J.-P. Bonnefont, M. Barth, et al., Assembly defects

- induce oxidative stress in inherited mitochondrial complex I deficiency, *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 65 (2015) 91–103.
- [47] A.F. Branco, A. Ferreira, R.F. Simões, S. Magalhães-Novais, C. Zehowski, E. Cope, A.M. Silva, D. Pereira, V.A. Sardão, T. Cunha-Oliveira, Ketogenic diets: from cancer to mitochondrial diseases and beyond, *Eur. J. Clin. Investig.* 46 (2016) 285–298.
- [48] P. Puchalska, P.A. Crawford, Multi-dimensional roles of ketone bodies in fuel metabolism, signaling, and therapeutics, *Cell Metab.* 25 (2017) 262–284.
- [49] H. Park, E. Davidson, M.P. King, The pathogenic A3243G mutation in human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} decreases the efficiency of aminoacylation, *Biochemistry (Mosc)* 42 (2003) 958–964.
- [50] Y. Koga, M. Davidson, E.A. Schon, M.P. King, Analysis of cybrids harboring MELAS mutations in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene, *Muscle Nerve Suppl.* 3 (1995) S119–123.
- [51] O.Z. Karicheva, O.A. Kolesnikova, T. Schirtz, M.Y. Vysokikh, A.-M. Mager-Heckel, A. Lombès, A. Boucheham, I.A. Krashennikov, R.P. Martin, N. Entelis, et al., Correction of the consequences of mitochondrial 3243A > G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria, *Nucleic Acids Res.* 39 (2011) 8173–8186.
- [52] R. Li, M.-X. Guan, Human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase corrects mitochondrial dysfunctions due to the tRNA^{Leu(UUR)} A3243G mutation, associated with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like symptoms and diabetes, *Mol. Cell. Biol.* 30 (2010) 2147–2154.
- [53] B.M. Zid, A.N. Rogers, S.D. Katewa, M.A. Vargas, M.C. Kolipinski, T.A. Lu, S. Benzer, P. Kapahi, 4E-BP extends lifespan upon dietary restriction by enhancing mitochondrial activity in *Drosophila*, *Cell* 139 (2009) 149–160.
- [54] M. Maalouf, J.M. Rho, M.P. Mattson, The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies, *Brain Res. Rev.* 59 (2009) 293–315.
- [55] A. Ruetenik, A. Barrientos, Dietary restriction, mitochondrial function and aging: from yeast to humans, *Biochim. Biophys. Acta* 1847 (2015) 1434–1447.
- [56] V.A. Narkar, M. Downes, R.T. Yu, E. Embler, Y.-X. Wang, E. Banayo, M.M. Mihaylova, M.C. Nelson, Y. Zou, H. Juguilon, et al., AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics, *Cell* 134 (2008) 405–415.
- [57] K. Burkewitz, Y. Zhang, W.B. Mair, AMPK at the nexus of energetics and aging, *Cell Metab.* 20 (2014) 10–25.
- [58] J.M. Corton, J.G. Gillespie, S.A. Hawley, D.G. Hardie, 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside. A specific method for activating AMP-activated protein kinase in intact cells? *Eur. J. Biochem.* 229 (1995) 558–565.
- [59] J.H. Seo, Y.M. Lee, J.S. Lee, H.C. Kang, H.D. Kim, Efficacy and tolerability of the ketogenic diet according to lipid:nonlipid ratios—comparison of 3:1 with 4:1 diet, *Epilepsia* 48 (2007) 801–805.
- [60] N. Douris, T. Melman, J.M. Pecherer, P. Pissios, J.S. Flier, L.C. Cantley, J.W. Locasale, E. Maratos-Flier, Adaptive changes in amino acid metabolism permit normal longevity in mice consuming a low-carbohydrate ketogenic diet, *Biochim. Biophys. Acta* 1852 (2015) 2056–2065.

The following are the supplementary data related to this article.



[Download : Download high-res image \(347KB\)](#)

[Download : Download full-size image](#)

Fig. S1. MELAS cells and patient skeletal muscle show a CI assembly defect.

(A) BN-PAGE analysis of CI intermediates of Ctrl, P and M cells. CI matrix and membrane intermediates were visualized by enhanced chemiluminescence using NDUFAF4 antibody for matrix arm intermediates and NDUFAF1 antibody for membrane arm intermediates. Antibodies have been probed sequentially with NDUFAF4 first and then NDUFAF1. CII (SDHA) was used as loading control. (B) Densitometric quantification of all CI assembly intermediates and (C) \approx 830 immunoblot bands. Data are presented as means \pm SEM of at least 3 independent experiments. Asterisk (*) indicates significant differences between groups ($p < 0.05$). (D) BN-PAGE analysis of CI intermediates of skeletal muscle of MELAS patient carrying 85% mutant load. CI matrix intermediates were visualized by enhanced chemiluminescence using NDUFAF4 antibody. CII (SDHA) was used as loading control.

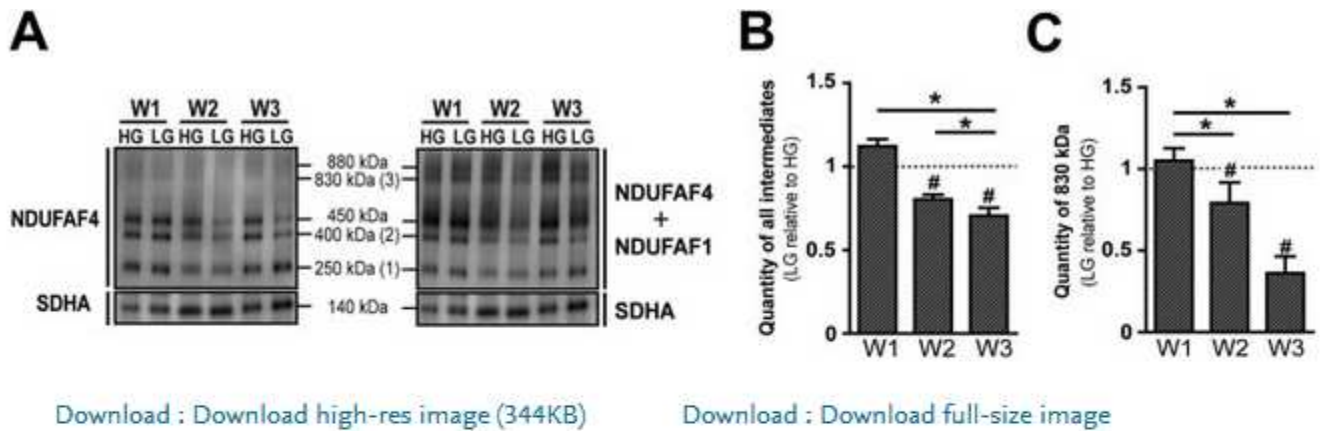


Fig. S2. Low Glucose improves the overall complex I assembly process of MELAS cells.

(A) BN-PAGE analysis of CI intermediates of M cells after 3 weeks of LG exposure relative to HG. CI matrix and membrane assembly intermediates were visualized by enhanced chemiluminescence, using NDUFAF4 and NDUFAF1 antibodies. Antibodies have been probed sequentially with NDUFAF4 first and then NDUFAF1. CII (SDHA) was used as loading control. (B) Densitometric quantification of LG versus HG immunoblot bands of all CI assembly intermediates and (C) \approx 830 KDa assembly intermediates. Results are expressed as fold changes relative to HG untreated M cells. Data are presented as means \pm SEM of at least 3 independent experiments. Statistical differences are indicated with an asterisk (*) and ($p < 0.05$). Differences between HG untreated and LG treated cells, are indicated with a sharp sign (#) ($p < 0.05$), or (##) ($p < 0.001$).

		Mitochondrial Activities (muscle)				Heteroplasmy levels	
		I/CS	II/CS	III/CS	IV/CS	muscle	urine
Gender	Ctrl	0,16 (0.10-0.32)	0,25 (0.15-0.40)	1,06 (0.70-1.8)	0,99 (0.60-1.40)	0	0
F	P1	0.10*	0.13	0.89	0.61	ND	70
F	P2	0.03*	0.12	0.72	0.72	ND	70
M	P3	0.05*	0.15	1.06	0.63	85	80
M	P4	0.09*	0.23	0.35*	0.48*	71	ND
F	P5	0.05*	0.17	0.84	0.56*	ND	50
F	P6	0.10*	0.24	1.06	0.66	77	ND
M	P7	0,16	0,20	0,72	1,18	36	ND

* significant decrease

ND: Not Determined

[Download](#) : [Download high-res image \(232KB\)](#)

[Download](#) : [Download full-size image](#)

Table S1. Relationships between OXPHOS enzyme activities and mutant loads in skeletal muscle samples from MELAS patients carrying the m.3243A > G mutation.

	Subcomplexes MW	Corresponding name in (16)	Subunit composition
1	250 kDa	Q	NDUFS2/NDUFS3/NDUFA5/NDUFS7/ NDUFS8/NDUFAF3/NDUFAF4
2	400 kDa	Q/P(p-a)	NDUFS2/NDUFS3/NDUFA5/NDUFS7/ NDUFS8/NDUFAF3/NDUFAF4/ND1 NDUFA1/NDUFA3/NDUFA8/NDUFA13
3	830 kDa	Q/P	NDUFS2/NDUFS3/NDUFA5/NDUFS7/ NDUFS8/NDUFAF3/NDUFAF4/ND1 NDUFA1/NDUFA3/NDUFA8/NDUFA13/ND2 NDUFC1/NDUFC2/ND4L/NDUFAF1/ESCIT

[Download](#) : [Download high-res image \(167KB\)](#)

[Download](#) : [Download full-size image](#)

Table S2. Nomenclature of CI subcomplexes. Corresponding names and assembly intermediate composition.

2.3. Résultats/ Discussion et Perspectives

2.3.1. Analyse du défaut d'assemblage du complexe I dans les cybrides MELAS

Dans un premier temps une analyse de la structure et de l'assemblage du complexe I a été réalisée en réalisant un BN-PAGE par électrophorèse en conditions non dénaturantes utilisant un anticorps dirigé contre NDUF6 (P-module) et NDUFS2 (Q-module). Cette première expérience nous a permis de mettre en évidence l'accumulation d'intermédiaires d'assemblage du complexe I pour les cybrides MELAS, ainsi qu'une réduction massive de l'holoenzyme.

Dans un second temps, un BN-PAGE a été réalisée en utilisant cette fois des chaperonnes de l'assemblage, NDUF4 et NDUF1. Ces chaperonnes ont l'avantage de se fixer au stade précoce de l'assemblage et de ne se détacher du complexe I qu'après l'ajout du N-module, permettant ainsi une étude de l'assemblage comprise entre les intermédiaires 250 à 830 kDa environ. Cette étude nous a permis de mettre en évidence un défaut d'assemblage du complexe I avec une accumulation des intermédiaires d'assemblage à l'exception de l'intermédiaire 250 kDa. Ce résultat laisse suggérer une perturbation dans les stades précoces du mécanisme d'assemblage du complexe I.

Dans un troisième temps une analyse par gel en deux dimensions (BN-PAGE et SDS-PAGE) a été réalisée afin de nous renseigner sur la nature de ses intermédiaires. Une étude par spectrométrie de masse des bandes issues du BN-PAGE a également été effectuée pour conforter ces résultats. Nous avons retrouvé les facteurs suivants : NDUFS2, NDUFS3, NDUFS7, NDUFS8, NDUF3 et NDUF10, qui correspondent à des accumulations d'intermédiaires précoces notamment au Q/Pp module (Guerrero-Castillo et al., 2017).

2.3.2. Réduction des intermédiaires d'assemblage, associé à une amélioration du métabolisme oxydatif dans les cybrides MELAS sous restriction glucidique

A partir de la deuxième semaine de traitement sous restriction glucidique, nous avons pu observer une augmentation de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire, ainsi qu'une augmentation de la respiration médiée à la production d'ATP dans les cybrides MELAS. En parallèle à cette amélioration du métabolisme oxydatif nous avons également retrouvé une diminution de l'accumulation des intermédiaires d'assemblage dès la deuxième semaine sous restriction glucidique. A la troisième semaine la quantité d'holoenzyme était significativement augmentée et associée à une diminution drastique des intermédiaires d'assemblage de taille 400/450 kDa.

En lien avec cette augmentation de la quantité d'holoenzymes à la troisième semaine nous avons pu mettre en évidence une augmentation de la quantité d'ADNmt ainsi que de la quantité de tous les complexes de la chaîne respiratoire dans les cybrides MELAS sous restriction glucidique suggérant une biogénèse mitochondriale accrue. Ce processus semble de plus être sous une dépendance chronologique, en effet après deux semaines sous restriction glucidique, les quantités des différents complexes de la chaîne respiratoire et de l'holoenzyme restent inchangées. La diminution de la quantité d'intermédiaires d'assemblage lors de cette deuxième semaine de restriction glucidique serait donc sous la dépendance d'un autre mécanisme, tel que des processus de mitophagie induite par la restriction en glucose, des études pilotes réalisées dans le laboratoire renforcent cette hypothèse.

3. Le glutamate un acide aminé clé dans le MELAS

3.1. Introduction

Comme mentionné précédemment nous assistons aujourd'hui à un essor de l'utilisation des données « Omics » dans la compréhension des différentes voies et dans la recherche de potentiels biomarqueurs des pathologies mitochondriales. La combinaison des analyses, avec les données à la fois de génomique, transcriptomique, métabolomique, permettent d'avoir une vue d'ensemble de la pathologie et de cibler au mieux les différentes voies métaboliques, ainsi que les différents acteurs (récepteurs, molécules...) qui diffèrent dans la pathologie.

Mon étude s'est donc portée sur l'analyse des différentes données de transcriptomique et de métabolomique comparant les cybrides SHSY-5Y contrôles et les mutants porteurs de la mutation m.3243A>G. Le résultat de cette comparaison nous a permis de mettre en évidence des signatures métabolomiques spécifiques, ainsi que des différences d'expression pour certaines enzymes et protéines impliquées dans ces voies métaboliques. Parmi les différents métabolites clés identifiés dans le syndrome MELAS, le glutamate, ainsi que les voies métaboliques impliquées ont été le point central de cette étude.

Nous avons ainsi retrouvé des concentrations de glutamate plus importantes dans les cybrides MELAS, comme mentionnée précédemment, le glutamate participe à des phénomènes d'excitotoxicité quand il est retrouvé en trop forte concentration. Nous avons retrouvé notamment des concentrations de glutamate intracellulaire significativement augmentées dans les cybrides MELAS SHSY-5Y et 143B. Le glutamate est un neurotransmetteur principal du SNC, mais des études montrent également le rôle majeur du glutamate comme substrat énergétique dans le cerveau (Hohnholt et al., 2018; Karaca et al., 2015). Notre étude s'est donc intéressée au rôle du glutamate dans la physiopathologie du MELAS, et son rôle dans les phénomènes d'excitotoxicité. L'ajout de corps cétoniques est connu pour modifier le métabolisme des acides aminés (Palaiologos and Felig, 1976; Yudkoff et al., 1997). Les effets anticonvulsivants retrouvés après régime cétogène notamment dans des pathologies tels que l'épilepsie seraient en lien direct avec le métabolisme du glutamate (Daikhin and Yudkoff, 1998; Yudkoff et al., 2007). De plus des précédentes études au laboratoire ont montré les effets positifs d'un traitement aux corps cétoniques sur la respiration et sur l'activité du complexe I chez les cybrides MELAS (Frey et al., 2017).

3.2. Article

Glutamate pathway dysfunction in a model of MELAS syndrome is alleviated by ketogenic diet

Sophie Belal¹, David Goudenege^{1,2}, Cinzia Bocca¹, Florent Dumont³, Juan Chao de la Barca^{1,2}, Valerie Desquirit-Dumas^{1,2}, Naig Gueguen^{1,2}, Guillaume Geffroy¹, Rayane Benyahia¹, Selma Kane¹, Salim Khiati¹, Celine Bris^{1,2}, Tamas Aranyi⁴, Daniel Stockholm⁵, Aurore Inisan¹, Aurelie Renaud¹, Valerie Thepot-Seegers¹, Magalie Barth², Dominique Bonneau^{1,2}, Gilles Simard², Pascal Reynier^{1,2}, Guy Lenaers¹, Franck Letournel⁶, Arnaud Chevrollier¹, Vincent Procaccio^{1,2}

¹UMR CNRS 6015-INSERM U1083, MitoVasc Institute, Angers University, Angers, France

²Biochemistry and Genetics Department, Angers Hospital, France

³Signalling and Cardiovascular Pathophysiology, INSERM UMR-S 1180, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

⁴Research center for natural science, Hungarian Academy of sciences - Budapest - Hungary

⁵UMRS 951, Ecole pratique des hautes études - Sorbonne - Paris - France

⁶UMR INSERM 1066 - CNRS 6021, MINT laboratory, Angers University, Angers, France

Glutamate pathway dysfunction in a model of MELAS syndrome is alleviated by ketogenic diet

Sophie Belal¹, David Goudenege^{1,2}, Cinzia Bocca¹, Florent Dumont³, Juan Chao de la Barca^{1,2}, Valerie Desquret-Dumas^{1,2}, Naig Gueguen^{1,2}, Guillaume Geffroy¹, Rayane Benyahia¹, Selma Kane¹, Salim Khiati¹, Celine Bris^{1,2}, Tamas Aranyi⁴, Daniel Stockholm⁵, Aurore Inisan¹, Aurelie Renaud¹, Valerie Thepot-Seegers¹, Magalie Barth², Dominique Bonneau^{1,2}, Gilles Simard², Pascal Reynier^{1,2}, Guy Lenaers¹, Franck Letournel⁶, Arnaud Chevrollier¹, Vincent Procaccio^{1,2}

¹UMR CNRS 6015-INSERM U1083, MitoVasc Institute, Angers University, Angers, France

²Biochemistry and Genetics Department, Angers Hospital, France

³Signalling and Cardiovascular Pathophysiology, INSERM UMR-S 1180, Université Paris-Saclay, Châtenay-Malabry, France

⁴Research center for natural science, Hungarian Academy of sciences - Budapest - Hungary

⁵UMRS 951, Ecole pratique des hautes études - Sorbonne - Paris – France

⁶UMR INSERM 1066 - CNRS 6021, MINT laboratory, Angers University, Angers, France

To whom correspondence should be addressed: Pr Vincent Procaccio M.D., Ph.D. Biochemistry and Genetics Laboratory, Angers University Hospital, 4 rue Larrey, 49933 Angers, France. Phone 33 2 41 35 78 54. Fax 33 2 41 35 58 83. E-mail: ViProcaccio@chu-angers.fr

Word count: 9854 words

Title: 90 characters

Abstract: 194 words

56 References, 8 Figures, 2 Tables, 1 Supplemental Figure, 2 Supplemental Tables

Abbreviations

Complex I, CI; Complex II, CII Oxidative Phosphorylation, OXPHOS; mtDNA, mitochondrial DNA; NADH Dehydrogenase, ND; Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Hydrate, NADH; Nicotinamide Adenine Dinucleotide, NAD⁺; Reactive Oxygen Species, ROS; Kilo Dalton, kDa; HG, High Glucose; KD, Ketogenic Diet; TCA, tricarboxylic acid cycle.

Keywords: Mitochondrial diseases; MELAS syndrome; OMICS; Glutamate; Ketogenic diet;

Abstract

The development of mitochondrial medicine is greatly impaired by the lack of efficient therapies targeting mitochondria. To better understand the pathophysiology of MELAS syndrome, neuronal cybrid cells carrying different mutant loads of the m.3243A>G mutation were first investigated. Through an integrated approach with a multi-OMIC approach including metabolomics and transcriptomics, specific biochemical signature profiles with key biomarkers specific to MELAS syndrome were identified in particular affecting the glutamate pathway. Increased level of glutamate was strictly correlated to the mutant load. Gene expression profiling of MELAS cells revealed key gene clusters including glutamate, GABA and TCA pathways. The results were supported by post-mortem brain tissue analysis of a MELAS patient confirming the dysregulation of several metabolites related to the glutamate pathway.

Ketogenic diet is known to reduce glutamate toxicity. MELAS cells exposed to ketone bodies during 48h showed a significant reduction of glutamate and improvement of mitochondrial functions, alleviating the accumulation of several intermediate metabolites of the TCA cycle. This integrated approach using a multi-OMIC strategy helped us understand the mechanisms of energy failure in MELAS syndrome, identified glutamate as potential biomarker, highlighting the usefulness of nutrition based strategies such as ketogenic diet in MELAS.

INTRODUCTION

Mitochondria considered as the power plant of the cells, produce ATP through Oxidative Phosphorylation (OXPHOS) located in the inner mitochondrial membrane (1). Mitochondria are encoded by both nuclear and mitochondrial genomes. Mitochondrial diseases are the consequences of mutations in either the nuclear genome or the mitochondrial DNA (mtDNA) leading to mitochondrial dysfunction (2, 3). The mitochondrial genome encodes for 22 transfer RNAs (tRNAs) and 2 ribosomal RNAs (rRNAs) required for the translation of 13 polypeptides, all included in OXPHOS complexes (4).

One of the most commonly encountered mtDNA mutations causing neuromuscular disease is the m.3243A>G variant which when there is a high percentage of mutant mtDNA is associated with the life-threatening MELAS syndrome (5). MELAS syndrome is clinically characterized by a triad of cardinal symptoms: lactic acidosis, stroke like episodes before the age of 40 and encephalopathy (6). This syndrome may affects several organs, is also heterogeneous at the clinical point of view and associated with a broad spectrum of additional symptoms and secondary clinical manifestations such as epilepsy, exercise intolerance and myopathy, dementia, deafness and many others (7).

The severity of the mitochondrial disorder is determined by the heteroplasmic rate which is the coexistence of a mixture of wild type and mutant mtDNA copies, named heteroplasmy (4). About 80% of MELAS syndrome are due to the presence of the m.3243A>G in *MT-TL1*. The m.3243A>G affects the *MT-TL1* gene coding for the tRNA^{Leu(UUR)} leading to the disruption of the structure, stability, amino-acylation and codon recognition of the tRNA^{Leu}, reducing the efficiency of the mitochondrial translational machinery (8–10). The disease is commonly associated with multiple partial respiratory chain defects, especially involving mitochondrial complex I and/or complex IV deficiencies (5, 11–13). However, complex I deficiency is often considered as a key component of MELAS pathophysiology as reported

into the literature (14–16). Additional pathogenic mutations have been also identified in other tRNAs mutations affecting protein synthesis or NADH Dehydrogenase (ND) subunits such as ND5, ND1 and ND6 subunits highlighting the role of complex I in MELAS pathophysiology (6, 17). A severe reduction of complex I activity was also identified in a neuronal-like model of MELAS (18, 19).

Despite considerable efforts to better understand the pathophysiology of mitochondrial disorders, there is no effective cure for mitochondrial diseases (4, 13). MELAS patients have been treated with several compounds which include coenzyme Q10 and vitamin supplementations that often failed to chronically improve the clinical outcome of MELAS patients (4, 12, 13). L-arginine and citrulline have been used to treat stroke-like episodes of MELAS (20). Ketogenic diet, a combination of carbohydrate restriction and the addition of ketone bodies has been proposed for decades as a treatment for pharmaco-resistant epilepsies (21). Very recently ketogenic diet has driven a lot of interest from clinicians and neurologists to treat patients with neurological disorders including MELAS patients (22–24).

We have previously shown that MELAS neuronal cybrids carrying the m.3243A>G are associated with a severe reduction of mitochondrial complex I activity and assembly, in line with previous results obtained on MELAS patient fibroblasts and muscle biopsies (18, 19, 25, 26). In addition, the long term exposure of MELAS cells with ketone bodies (KB) improved significantly complex I activity and assembly (24) .

Here, to evaluate the consequences of the MELAS mutation, a multi-OMICS approach of transmitochondrial mutant cybrid neuronal MELAS was used to unravel pathways and potential biomarkers of MELAS syndrome. Our study revealed key metabolites such as glutamate and alpha-ketoglutarate linked to critical metabolic pathways. Glutamate was significantly reduced in MELAS cells after a short exposure of KB, suggesting that ketogenic diet may be beneficial for MELAS patients.

RESULTS

A multi-OMIC approach highlights a specific signature of MELAS mutant cells.

To gain a first insight in MELAS metabolic changes, targeted metabolomic study was carried out to quantify a total of 188 standard metabolites in cellular extracts from mutant cells carrying different mutant loads (from 70%, 90% and 98%) compared to controls cells. Unsupervised Principal Component Analysis (PCA) of metabolomics data from parental cells (n=10) and mutant carrying the MELAS mutation with different mutant loads (n=30) showed a clear separation between mutant and non-mutant cells (**Figure 1A**), or even when we compared the different mutant loads (**Figure 1B**) validating the metabolomic analysis.

Mutant cells harboring 70 to 98% MT loads were compared to control cells, and the metabolic signature of MELAS was characterized by lower levels of 6 metabolites (C0, C2, C4, C16, C18, C18:1) and 10 amino acids (alanine, glutamine, serine, lysine, proline, glycine, serotonin, spermine, arginine and taurine) (**Figure 1C**). Interestingly, arginine and taurine 2 key amino acids involved in the pathophysiology of MELAS were reduced in mutant cells (27, 28). On the contrary, several phospholipids, lysophospholipids and sphingomyelins were significantly increased.

In addition, the metabolite signature was compared between the different mutant loads (**Figure 1D**). The metabolic signature of MELAS cells according to the mutant load was characterized by reduced levels of 10 amino acids (phenylalanine, tyrosine, valine, tryptophan, isoleucine, leucine, threonine, histidine, methionine and alpha-aminoadipic acid (alpha-AAA) in the 70% and 90% MT compared to 98% MT. On the contrary, 14 metabolites including 6 phosphocholines and lysophosphocholines, 8 amino acids (ornithine, acetyl ornithine, trans-4-hydroxyproline, aspartic acid, alanine, glutamine, glutamate and DOPA were significantly increased in 98% MT cells compared to lower mutant loads (**Figure 1D**)

thus pointing on highly specific changes in amino-acid and biogenic amine metabolites, according to the level of heteroplasmy.

Glutamate level is correlated to the mutant load and mitochondrial complex I activity.

Based on metabolomic analysis, glutamate was further quantified in MELAS cybrid cells, confirming higher intracellular concentrations of glutamate in mutant cells with a 3 and 4 fold increases compared to control cells (**Figure 2A**). Interestingly, intracellular glutamate concentrations in mutant cells were strictly correlated to the heteroplasmy level, increasing with the mutantload (**Figure 2A**). Similarly, intracellular concentration of glutamate was increased by 55% in another cell type, 143B cybrid mutant cells carrying the m.3243A>G mutation with 98% MT load compared to controls (**supplemental S1**).

To check if the increased glutamate concentration was correlated to the reduction of mitochondrial complex I activity seen in mutant cells (**Figure 2B**), controls cells were further exposed to rotenone a complex I inhibitor during 15h. The complex I reduction was associated with a strong elevation of intracellular glutamate (+245% compared to untreated cells) suggesting that mitochondrial complex I activity regulates the glutamate use (**Figure 2C**). As expected, complex I activity after rotenone exposure was reduced by 58.5% compared to untreated cells (**Figure 2D**). In addition, extracellular glutamate level was also significantly increased in MT cells carrying different mutant loads compared to control cells (**Figure 2E**). It has to be noted that the glutamate level in 98% MT was significantly reduced compared to lower MT cells.

Since glutamate production comes from the conversion of glutamine, we monitored the level of intracellular glutamate in cells cultured in medium with or without glutamine. In both control cells and 98% MT cells, most of the intracellular glutamate derived from glutamine,

as shown by the reduction of intracellular glutamate in the glutamine-free medium (**Figure 2F**).

Transcriptomic signature of MELAS 98% MT cells showed an up-regulation of glutamate and glutamine metabolism pathways.

To further gain insights into the molecular changes correlated to gene expression, gene expression profiling was carried out in 98% MT cells. PCA analyses and unsupervised clustering were performed and normalized transcripts reads count PCA analysis confirmed the cluster of 98% MT load versus control cells (**Figure 3A**). Transcriptomic signature clearly differed between mutant and control cells. From gene expression profiling obtained for MELAS cells, a total of 4380 and 2159 transcripts corresponding to 4115 and 2046 genes showed significant values between 98% MT vs control cells with a p-value ≤ 0.05 (both FC ≥ 1.5 and ≥ 2) (Supplemental Table 1). Among them, 48% of genes were up-regulated and 52% were down-regulated in MT cells.

The gene set enrichment analysis based on REACTOME pathway database predicted a total of 955 pathways with a p-value ≤ 0.05 indicating a significant and massive enrichment (Supplemental Table 2). In line with the glutamate and mitochondrial dysregulation, gene expression analysis was focused on 3 specific REACTOME pathways (29) including “Glutamate and glutamine metabolism” (R-HSA-8964539) “GABA synthesis, release, reuptake and degradation”; (R-HSA-888590) and “TCA cycle” (R-HSA-71403) (**Table 1**).

All of them included significant (p<0.01) differential expression between 98% MT vs control cells for the large set of genes from the three main clusters (**Table 1**). Several genes belonging to the glutamate and GABA pathways were significantly changed. Among the upregulated genes, *GLUD1* encoding for Glutamate Dehydrogenase 1 (GDH) converting L-

glutamate into alpha-ketoglutarate with a key role in glutamine anaplerosis and glutamate Decarboxylase 1 (GAD1) which catalyzes the production of gamma-aminobutyric acid from glutamate were overexpressed in MT cells. Several genes encoding enzymes of the mitochondrial TCA cycle were also upregulated including Citrate Synthase, Isocitrate Dehydrogenase, Succinate Dehydrogenase Complex, except IDH2 and SDHC genes and the Succinate-CoA Ligase family enzymes. To be noted, malic enzyme (ME3) gene, the mitochondrial isoform catalyzing the decarboxylation of malate to pyruvate using NAD⁺, was downregulated in mutant cells.

Ketone diet exposure in MELAS cells restores intracellular glutamate levels, ameliorating mitochondrial dynamics and mitochondrial respiratory activities.

It was previously shown that the switch from a glycolytic to beta-oxidation metabolism with ketone bodies (KB), acetoacetate and β -D-hydroxybutyrate, improved mitochondrial function in MELAS cells (24). To reconsider the effect of KB on glutamate levels, the 98% MT cells were exposed to KB during 48 hours. A significant reduction of almost 50% intracellular glutamate level was seen in the 98% MT cells, whereas the extracellular glutamate concentration was unchanged in mutant cells (**Figure 4A-B**). No variation in intra and extracellular glutamate levels in control cells exposed to KB was identified (**Figure 4A-B**). Similar results were obtained with the 143B cybrid MT cells carrying high mutant load of the MELAS mutation, whereas KB increased intracellular glutamate levels in 143B control cells (**Supplemental 1 A**).

Glutamate had previously been shown to be toxic to neuronal activity and cellular growth, we evaluated the protective role of KB after exposing MT cells to high concentrations of glutamate. The 98% MT cells were cultured in standard medium or KB (**Figure 4C**) and cell proliferation was measured in the presence or absence of glutamate (50 μ M). Our results

showed that the cell growth of 98% MT in standard medium was fully abolished in the presence of 50 μ M glutamate concentration (**Figure 4C**) whereas 50 μ M of glutamate do not limit their cell proliferation in KB conditions. Cell growth rates were inversely proportional to the increased intracellular glutamate concentration (data not shown).

Besides these effects on cell growth, the addition of KB was shown to be protective, counteracting the toxic effects of glutamate. Indeed, 24 hours of treatment with 30 μ M of glutamate led to cell death, while cells cultured in KB medium survive to the high glutamate concentration (**supplemental 1B**).

The toxicity of a high intracellular glutamate concentration was further investigated on the mitochondrial network. While control cells displayed a highly connected mitochondrial network, the mitochondrial network was fragmented in untreated 98% MT cells showing a distribution of isolated organelles (**Figure 4D1 4D2- -supplementary 1D1-1D2**), Interestingly, the treatment with KB allowed a restoration of mitochondrial elongation and fusion in MELAS cells (**Figure 4D2**). Interestingly, control cells exposed to high glutamate concentration grown in standard conditions induced mitochondrial swelling and fragmentation, while further addition of KB restored a connected network, demonstrating that KB was protective against glutamate toxicity (**Supplementary 1- D1-D2 D-E**).

Mitochondrial respiration and enzymatic activities are restored by KB exposure in MELAS mutant cells.

The switch from a glycolytic to beta-oxidation metabolism with KB in MELAS cells showed a significant increase (60%), of the routine respiration and maximal respiration capacity in cells exposed to KB while mitochondrial respiration of treated or untreated control cells was unchanged (**Figure 5A-B**). This was paralleled with a significant 2 fold change increase of

mitochondrial enzyme activities (complex I, II and SDH related to citrate synthase) in cells treated with KB for 48 hours, compared to untreated cells (**Figure 5C**).

The m.3243A>G MELAS mutation affects the Glutamate/GABA pathway.

Based on the above results, the main enzymes involved in glutamate metabolism were further investigated, downstream of the transformation of glutamine to glutamate by the glutaminase. The first one consists in generating alpha ketoglutarate by the glutamate dehydrogenase (GDH) (30), while the second pathway generates succinate by the successive involvement of the glutamate decarboxylase (GAD1) catalyzing the decarboxylation of glutamate to GABA, then the 4-Aminobutyrate aminotransferase (ABAT) leading to succinic semialdehyde (SSA), then the succinate-semialdehyde dehydrogenase (SSADH) generates succinate, a complex II substrate (**Figure 6A**). Importantly, defects in these enzymes are responsible for severe neurometabolic disorders, or epileptic seizures, mental retardation and generalized dystonia (30–32)

Gene expression profiling highlighted the overexpression of GLUD1 encoding for GDH in mutant cells (**Figure 6A and Table 1**). We first monitored the conversion of glutamate into alpha ketoglutarate through GDH activity. A four-fold elevation of GDH activity in 98% MT cells was seen concomitant with the overexpression of the protein (**Figure 6B-6E1-2**), while alpha-ketoglutarate concentrations remained similar between control and 98% MT cells (**Figure 6C**).

Interestingly, GDH enzymatic activity which was already high was unchanged whereas the expression levels of both downstream metabolites alpha ketoglutarate and GABA measured by mass spectrometry were significantly reduced (71 and 63% respectively) in mutant cells exposed to KB (**Figures 6A-D**) suggesting that KB stimulated the use of mitochondrial TCA

intermediates activating anaplerotic energy metabolism (33). It has to be noted that alpha ketoglutarate increased in KB treated control cells. The expression level of key proteins GAD1, ABAT and GDH of the glutamate pathway was assessed according to actin and tubulin as loading controls. Protein expression of GAD1 and GDH was significantly induced with about a two-fold increase in mutant cells. The GDH expression of MT cells exposed to KB was restored to the level of control cells (**Figure 6E1-2**).

Curiously, ABAT transcripts (data not shown) and protein levels were completely abolished in all MT cells, a condition that a KB-based treatment could not restore. (**Figure 6E1-2**). In addition, we observed a drastic increase of GAD1 mRNA in the 98% MT measured by qPCR, compared to control cells (data not shown), thus confirming, GAD1 overexpression seen with gene expression profiling (**Table 1, figure 6E1-2**).

The dysfunction of mitochondrial TCA cycle is restored by KB exposure in MELAS mutant cells.

The TCA intermediates measured by mass spectrometry showed that pyruvate concentration was reduced (76% reduction) in MELAS cells compared to control cells, because part of the pyruvate produced during glycolysis was directly converted into lactate (**Figure 7A-B**) in agreement with previous study (24).. Furthermore, citrate concentration was 4 times higher in 98% MT cells than in control cells, representing one of the points of blockade of the TCA cycle in MT cells (**Figure 7C**), while succinate concentration was reduced by more than half in 98% MT compared to controls (**Figure 7E**). In addition, malate and fumarate concentrations were increased by more than 300% (319 and 333% respectively) in mutant cells, disclosing two additional blocking steps in the TCA cycle related to the reduction of

oxidation of different substrates through the NAD⁺/NADH ratio (**Figures 7F-G**). The level of alpha ketoglutarate was unchanged between control and 98% MT cells, suggesting that alpha ketoglutarate was converted to glutamate via the GDH bidirectional enzyme responsible for the glutamate accumulation in mutant cells (**Figure 6C -7D**).

Interestingly, exposure to KB resulted in a reduction of 98% of pyruvate concentration in control and mutant cells (**Figure 7A**) in parallel with a reduction of lactate production in KB-treated mutant cells compared to untreated cells, suggesting that glycolysis was reduced in cells under KB exposure (**Figure 7B**). It is important to note that the treatment of KB allowed the TCA cycle to proceed in a more physiological manner, unlocking the various NADH-dependent TCA cycle blockages, as citrate, malate, fumarate and alpha ketoglutarate concentrations were lowered by KB treatment (**Figure 7C- D-F-G**), while succinate concentration was increased (**Figure 7E**). In KB-treated control cells, a significant reduction of 47% was observed only with pyruvate without other metabolite changes (**Figure 7A**).

The glutamate pathway is altered in MELAS autopsic brain tissue.

Mass spectrometry was performed on autopsic brain tissue of a 32-year-old woman harboring the m.3243A>G mutation who died of MELAS syndrome. The analysis revealed increased concentrations of a large number of amino acids compared to control brain tissue (**Table 2**), including, glutamine and glutamate but also alanine, proline, arginine, histidine, ornithine, isoleucine, methionine, threonine, valine. All these amino acids may contribute to the glutamate pathway, thus their increase strongly suggested that glutamate catabolism was also impaired in MELAS brain tissues. Similar to MELAS cells, the concentration of GABA was reduced in brain tissue of the MELAS patient, while immune-histochemical studies revealed a reduction of GDH, GAD and ABAT staining in different brain areas (fronto lobe, lentiform

nucleus, thalamus+ subthalamic nucleus, cerebellum) of the MELAS patient compared to 5 control individuals (**Figure 8A-B-C**).

DISCUSSION

The development of mitochondrial medicine is greatly impaired by the lack of efficient therapies targeting mitochondria. Moreover, reproducible marked clinical improvement has been difficult to verify, due to the lack of available mitochondrial biomarkers (1). Hence, special efforts have to be made to a better understanding of the pathophysiology of mitochondrial disorders and to identify such biomarkers to move to efficient therapies. Substantial progress has been made with OMICS technologies in recent years, providing great insights into disease mechanisms of mitochondrial disorders (34, 35). The consequences of mtDNA heteroplasmy using in vitro cellular models carrying different mutant loads of the m.3243A>G mutation was assessed combining multi-OMICS strategy with metabolomics and transcriptomics analyses in order to identify pathways and biomarkers which may yield potential therapeutic targets.

A specific multi-OMIC signature of MELAS cells. Specific biochemical signature profiles with key biomarkers specific to MELAS syndrome were identified. Targeted metabolomics studies using high performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry quantified a total of 188 metabolites of MELAS neuronal cybrid cells. Latent variable-based statistical methods allowed the identification of discriminating metabolites. Among them, 2 key amino acids, arginine and taurine, were shown to be significantly reduced in mutant cells compared to control cells, demonstrating the usefulness of targeted metabolomics. Both amino acids have been previously shown to be reduced in blood of MELAS patients and have been proposed to be used to treat MELAS patients (18, 27, 28) .

When we further compared the different percentages of mutant cells (from 70 to 98% MT loads) to control cells, the metabolic signature of MELAS was characterized by the significant increase level of L-DOPA and amino acids such as glutamate, glutamine and alanine. The L-DOPA accumulation was shown to contribute to mitochondrial dysfunction especially in Parkinson's disease (36). In addition, the increase of alanine in mtDNA mutant cells was considered as a common biomarker in most patients with OXPHOS disorders.

In the present study, we explored in detail the role of glutamate on mitochondrial function whose metabolomic results showed a significant increase in MELAS cells compared to control cells.

Glutamate appears as a key marker of MELAS pathophysiology. Glutamate is a non-essential amino acid, crucial for neurotransmission in the central nervous system, the disruption of which leads to neurological disorders (37) and Glutamate shares a key role in amino acid metabolism allowing for glutamate-alpha-ketoglutarate (α KG) flux into the mitochondrial tricarboxylic acid (TCA) cycle (**Figure 9A**). A defect of cellular glutamate uptake was identified before in MELAS neuronal cybrid cells which was related to the reduction of mitochondrial ATP production in mutant cells highlighting the role of glutamate in the pathophysiology of MELAS (38). Extra and intra-cellular glutamate accumulation may trigger ROS overproduction and apoptosis as shown in neuronal cell studies (39, 40).

Our several approaches have highlighted the dysregulation of the glutamate pathway showing that intracellular glutamate level was tightly correlated to the MELAS mutant load himself and with the magnitude of mitochondrial complex I inhibition. Extracellular glutamate concentration was also significantly elevated in neuronal cybrids media carrying intermediate MELAS mutant loads (70% and 90% MT) compared to control cells, but was reduced in high mutant load (98% MT) in line with the inhibition of glutamate transport as shown before (38).

These results were confirmed in osteosarcoma cybrid cells expressing high level of the MELAS mutation showing that the dysregulation of glutamate was not restricted to neuronal cells. In addition, in the context of homoplasmic mtDNA mutations, glutamine, the precursor of glutamate, was shown to be reduced by the TCA cycle leading to the synthesis of aspartate, which is essential for nucleotide synthesis (41). Thus, increased amino acid levels, including glutamate, could be part of a compensatory response to the primary OXPHOS defect (41, 42). The mass spectrometry analysis of the different intermediates of the TCA cycle in MELAS cells revealed the accumulation of citrate, malate and fumarate, the substrates linked to the oxidation of NADH, dependent on mitochondrial complex I.

Targeted metabolomic approach was further combined with gene expression profiling of 98% MELAS neuronal cybrids. The metabolic adaptation of MELAS cells was clearly confirmed by the specific transcriptomic signature as highlighted by the glutamate pathway. According to the reactome database, we focused on three main clusters related to the glutamate, GABA pathways and TCA cycle. Among these clusters, key enzymes such as GAD1 and GDH, both involved in the glutamate pathway were upregulated in the 98% MELAS cells. A transcriptomic approach already performed in MELAS cybrid cells in 143B background, showed major transcriptional reprogramming correlated to the heteroplasmy level (43). Further experiments should be done to assess the expression profiling in lower mutant loads.

Mitochondrial dysfunction is alleviated by ketone body exposure. Metabolic strategies are being developed as potential therapies for mitochondrial diseases. To reduce the toxic impact of high glutamate concentration, we exposed MELAS cells to KB which lead to a switch from a glycolytic metabolism to mitochondrial beta-oxidation. The KB exposure of MELAS cells unlocked NADH-dependent TCA cycle blockades restoring a normal function of the Krebs cycle and significantly increased oxidative metabolism (Figure 9B). Indeed the TCA cycle

activity was reflected by the reduction of several intermediate metabolites such as citrate, malate and fumarate, depending on NADH oxidation. It was shown that ketogenic diet used to treat refractory epilepsy for almost a century may represent a treatment option for MELAS syndrome (24). Moreover, we have recently shown that the use of KB alleviates mitochondrial dysfunction in MELAS cells carrying almost 100% mutant load (24). The mutant neuronal cybrides carrying the m.3243A>G, treated over a period of 4 weeks demonstrated a significant improvement of complex I assembly and activity (24).

Our present study revealed that KB exposure reduce the accumulation of glutamate in MELAS mutant cells (**Figure 9B**). While TCA cycle intermediates were significantly reduced after KB exposure, the alpha ketoglutarate increased suggesting that alpha ketoglutarate was an important marker of anaplerotic energy metabolism (41). We also identified that GABA was reduced in KB treated control and mutant cells. A similar metabolite profiling was obtained in brain autopsic tissue from a MELAS patient with the accumulation of several amino acids including glutamate while GABA was reduced.

It was shown that α -ketoglutarate plays also an important role in mitochondrial disease pathophysiology and age-related neurodegenerative diseases which is linked in particular to the enzymatic reduction of α -ketoglutarate dehydrogenase complex as shown in Alzheimer brain (44).

Indeed, glutamine/glutamate/ α -ketoglutarate metabolic axis was shown to be dysfunctional in the *Ndufs4(KO)* mice and this pathway was rescued by inhibition of mTOR due to treatment with rapamycin (45). This study highlighted α -ketoglutarate as a functional mitochondrial complex I substrate to support oxidative phosphorylation. It has also to be noted that glutamate was significantly lower in the brainstem of *Ndufs4(KO)* versus controls (45). Concerning GABA levels, mutant cells disclosed a reduced concentration compared to control cells, while in both cell types, GABA concentrations were decreased by KB exposure.

Hence ketogenic diet appears as a promising alternative strategy to modulate mitochondrial function but also mitochondrial biogenesis (24, 36). An open label non-randomized clinical trial with a limited patient number using bezafibrate known to stimulate mitochondrial biogenesis was recently evaluated in patients carrying the m.3243A>G mutation (46). In this study, an alteration of glutamine metabolism was also revealed with a significant increase of several amino acids including alanine and glutamate. However, differentiation factor 15 (GDF-15) and fibroblast growth factor (FGF-21) representing biomarkers of mitochondrial diseases were significantly increased suggesting a possible aggravation of the disease due to the treatment with bezafibrate (46). Hence, this study suggests that bezafibrate should be used with caution to treat patients with mitochondrial disorders but also highlighting the usefulness of measuring glutamate concentration as a biomarker to follow efficacy and toxicity of candidate drugs in future clinical trials in MELAS syndrome.

Conclusions

This work allows better understanding the impact of glutamate metabolism in the pathophysiology of MELAS, highlighting metabolic strategies such as ketogenic diet as potential therapeutic targets for reducing glutamate toxicity and alleviating the blockade of TCA cycle due mainly to complex I deficiency in MELAS syndrome.

MATERIAL AND METHODS

Patient samples. Patient samples were taken after informed consent (IRB Committee of the University Hospital of Angers, Authorization number: AC-2012-1507). Post mortem brain tissue samples of a MELAS patient, a woman who died at 32 years of age and gender matched control brain samples were collected and frozen immediately after death.

Cell culture. The SH-SY5Y neuronal control cells and mutant cybrid cells carrying the m.3243A>G with 98%, 90% or 70% mutant loads and osteosarcoma cybrid control and mutant cells were cultured in standard DMEM high glucose media (4.5 g/L) or in low glucose (0.5 g/L) (PAN biotech, Aidenbach, Germany), supplemented with 10% fetal bovine serum (PAN biotech), 1% glutamine and 50 µg/mL uridine (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, USA) at 37 °C in presence of 5% CO₂ as described elsewhere (18). Control and mutant cybrids in 143B osteosarcoma background were cultured in 2/3 DMEM F-12, 1/3 Amniomax (Gibco) medium supplemented with 10% SVF (PAN biotech), 100 µg/ml sodium pyruvate and 50 µg/ml uridine. Control and mutant cells were exposed to 5 mM of acetoacetate and β-D-hydroxybutyrate (Sigma Aldrich, Lyon, France) in low glucose medium during 48 hours.

All cell lines were routinely tested for the absence of mycoplasma contamination. For the experiments, cells were trypsinized, and immediately analysed for oxygraphic measurements or frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Deconvolution microscopy. To assess the mitochondrial network (47), cells were incubated during 20 minutes with MitoTracker green FM (Invitrogen™) to visualize mitochondria (green) and 5 min 0.1µg/ml Hoechst 33342 to visualize the nucleus (blue). Coverslips were mounted in housing and placed on the stage of an inverted wide-field microscope ECLIPSE

Ti-E (Nikon, Tokyo, Japan) equipped with a 100X oil immersion objective (Nikon Plan Apo100x, Tokyo, Japan, N.A. 1.45) and an Andor NEO sCOMS camera controlled by Metamorph 7.7 software (Molecular Devices, Sunnyvale, CA). A precision, piezoelectric driver mounted underneath the objective lens allowed faster Z-step movements, keeping the sample immobile while shifting the objective lens. 35-one image planes were acquired along the Z-axis at 0.1mm increments. For mitochondrial network characterization, acquired images were iteratively deconvolved using Huygens Essential software (Scientific Volume Imaging, Hilversum, The Netherlands), with a maximum iteration scored 50 and a quality threshold at 0.01.

Mitochondrial enzymatic activities. Activities of complexes I, II and SDH (succinate dehydrogenase) of the respiratory chain were measured at 37°C with a UV mc^2 spectrophotometer (SAFAS, Monaco) on mitochondrial enriched fraction. Briefly, cell pellets were resuspended in a volume of 25 μ l/million cells of cell buffer (saccharose 250 mM, TRIS 20 mM, EDTA 2 mM, BSA 1mg/mL, pH 7.4). After a freezing-thawing cycle, cells were centrifuged (16000 rpm, 1 min) and resuspended in the same volume of cell buffer. For complex I activity, an additional step of sonication (6 cycles of 5 seconds with a 30 seconds stop) was required. 0.3 million cells were then incubated at 37°C in a reaction medium (KH₂PO₄ 100 mM, pH 7.4, KCN 0.5M, Azide 1 mM, BSA 50mg/ml, ubiquinone-1 2.5 mM and DCPIP 5mM). The reaction was started by adding 12mM NADH and the disappearing rate of DCPIP was measured at 600 nm for 2 minutes. The unspecific activity was determined by adding rotenone 2.5 mM at the middle of the kinetic. For complex II activity, 0.5 million cells were added to a reaction buffer (KH₂PO₄ 100 mM, pH 7.5, KCN 10mM, EDTA 10 mM, BSA 50mg/ml, rotenone 2.5 mM, antimycin 1 mg/ml, succinate 0.5 M and DCPIP 5 mM) and the reaction was initiated by adding 2.5 mM of ubiquinone-1. The disappearing rate of DCPIP

was measured at 600 nm and the background was subtracted by using thenoyltrifluoroacetone 40 mM. For SDH, a volume equivalent to 0.5 million cells was added to the reaction medium (KH₂PO₄ 100 mM, pH 7.5 KCN 10mM, succinate 0.5 M and Phenazine methosulfate 20 mM,) and the reaction was initiated by adding 5 mM of DCIP.

Enzymatic activities of the respiratory chain complexes were normalized with respect to citrate synthase activity measured as follows. This activity was measured by adding 0.1 million cells to the following reaction mix (DTNB 1mM, oxaloacetic acid 10 mM, acetyl coA 0.3 mM, triton X100 0.1%) and the appearing rate of CoA-SH was measured at 412 nm.

Mitochondrial respiration measurements. Oxygen consumption was measured in intact cells using an oxygraphic equipment (Oroboros, Innsbruck, Austria). The O₂ consumption was measured in routine respiration, and after complex V inhibition with oligomycin (1mg/ml). The maximal respiration capacity was then measured by the successive additions of increasing doses of FCCP up to maximal respiration rate. The protein concentration was determined using the BCA assay according to the manufacturer recommendations (Pierce, BCA Protein Assay Kit).

Targeted metabolomics analyses of cell homogenates. A targeted, quantitative metabolomic approach using the Biocrates AbsoluteIDQ p180 kit (Biocrates Life sciences AG, Innsbruck, Austria) on an AB Sciex QTRAP 5500 (Life Sciences SCIEX, Villebon sur Yvette, France) mass spectrometer enables the quantification of up to 188 different endogenous molecules, including acylcarnitines, amino acids, biogenic amines, glycerophospholipids, sphingolipids, and sugar as described elsewhere (48). Flow-injection analysis (FIA-MS/MS) was used for quantifying acylcarnitines, glycerophospholipids, sphingolipids and sugar, whereas liquid chromatography (LC) allowed the separation of amino acids and biogenic amines prior to

detection with mass spectrometry (LC-MS/MS). Samples were prepared according to the Biocrates Kit User Manual. Briefly, after thawing on ice, metabolites were extracted in a methanol solution using ammonium acetate after drying the filter spot under nitrogen flow and derivatizing with phenylisothiocyanate for the quantification of amino acids and biogenic amines. The extracts were finally diluted with MS running solvent before FIA and LC-MS/MS analysis. After validation of the three levels of quality controls (QCs) used in the kit, the metabolite concentrations were normalized to protein concentrations.

Detection of TCA intermediates using non-targeted metabolomics. In order to complete the targeted signature obtained with Biocrates Absolute IDQ p180 kit, the non-targeted reversed-phase (RP) metabolomics approach previously validated and published was adapted (49). Cell layers were washed twice with an aqueous solution containing 0.22% NaCl before being quenched with cold MeOH. Cell suspension was then collected in aliquots of one million cells and stored at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis. Internal quality controls (QCs) were generated by mixing the samples together before the extraction protocol and treated similarly. Krebs cycle intermediates were then extracted adding a mixture of H₂O/MeOH. After centrifugation, supernatants were evaporated to dryness and samples were reconstituted with an aqueous solution (2% MeOH) before the UHPLC-HRMS (Ultra High Pressure Liquid Chromatography-High Resolution Mass Spectrometry) analysis in negative mode on a Thermo Scientific Q Exactive mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany) coupled to Dionex UltiMate® 3000 UHPLC (Dionex, Sunnyvale, CA, U.S.A.). Ionisation conditions, chromatography and MS parameters were identical to those previously described (49–51).

Detection of compounds were performed thanks to a TraceFinder 4.1 processing method based on our in-house commercial database (Mass Spectrometry Metabolite Library of

Standards, IROA Technologies, Bolton, MA, U.S.A.) focused only on TCA intermediates with an identification at level of 1(52) (m/z ratio lower than 5 ppm, perfect isotopic pattern, RT drift lesser than 5 s, and/or two identical fragments). Several quality parameters were checked: CV (Coefficient of Variation) lower than 30% in QC, a RT drift under 10 sec and a linearity of dilution with an r^2 lower than 0.7. Data were normalized to the samples DNA content measured by nanoDrop (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, U.S.A.).

Metabolite quantification. Glutamate intracellular or extracellular concentrations were quantified following the manufacturer recommendations (Glutamate Assay Kit, Abcam). Amino acid chromatography in brain post mortem tissues was performed using a routine analytical procedure which can accurately detect and quantify 37 amino acids and amino acid-derived molecules by means of an UptiSphere BP2 chromatography column coupled with an API 3000 Triple Quadrupole Mass Spectrometer (AB Sciex®). Frozen pellets of mutant cells were suspended in 100 μ L specific lysis buffer (sucrose 250mm, EGTA 0.5mm, HEPES 10mm, Triton 10X and Antiprotease cocktail).

DNA extraction and quantification of mtDNA heteroplasmy. DNA extraction and quantification of the mutant load was performed as described elsewhere (18).

Gene expression profiling. RNA preparation and microarray hybridization: Total RNA was extracted after lysing samples with TRIzol reagent (Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.), using the RNeasy Micro kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), according to the manufacturer's recommendations. Quantity and quality of the extracted RNA was assessed by microvolume spectrophotometry (Nanodrop 1000, Thermo Fisher Scientific). A Bioanalyzer

2100, with a RNA6000 Nano kit (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, U.S.A.) was used to assess RNA quality. A RNA integrity number of 7.00 or more was achieved for all samples. Biotinylated, amplified cRNA was generated using the Illumina Total Prep RNA Amplification kit (Ambion, Life Technologies, Carlsbad, CA, U.S.A.), according to the manufacturer's recommendations. cRNA was hybridized on Illumina HumanHT-12 v4 Expression BeadChips, stained and detected with the iScan system, according to the manufacturer's protocol (Illumina, San Diego, CA, U.S.A.). GenomeStudio 2011 (version 1) and its Expression Analysis Module (version 1.9.0) were used for signal extraction and quantile normalization (Illumina). Gene expression profile datasets are available from the following database: GEO accession number.

Quality assessments, normalization and statistical analysis of gene expression. Data were analyzed using R version 3.6.3 (33) and Rstudio version 1.3.959. Raw data matrixes were extracted from .idat files using Illumina package (53). For the normalization step, we applied a quantile normalization using Limma with a log₂ transformation to obtain normalized data matrix (54, 55). As quality control, unsupervised analysis was assessed using hierarchical clustering (Pearson's dissimilarity and complete linkage) and Principal Component Analysis (PCA). No technical bias or outlier sample had to be taken into account in the downstream analysis. To find differentially expressed genes between MELAS and control cells we applied a t-test on gene variables. Fold-changes were computing with delog values. Functional analyses were made through the use of MSigDB genesets database (56) using binomial enrichment tests.

Quantitative PCR. Total RNA was purified using an RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. 2 µg of RNA were reverse transcribed and qRT-PCR was

performed in triplicates (Applied Biosystems). Each reaction (final volume 10 μ l) contained 100 ng of cDNA, 5 μ l of Power SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) and 0.5 μ M of each forward and reverse primers. Two sets of primers were designed to measure the mRNA expression level of GAD67, ABAT and *GAPDH and actin* was used as loading control (primer sequences are available on request).

Western Blot analysis. Frozen pellets of cells were resuspended in 1X protease inhibitor cocktail (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, Roche Applied Science, Bale Switzerland) and 1X RIPA (Radioimmunoprecipitation assay) buffer. A volume corresponding to 50 μ g protein for GDH and GAD or 90 μ g for ABAT was added to a Laemmli buffer (277.8 mM Tris-HCL pH 6.8, 44.4% (v/v) glycerol, 4.4% LDS, 0.02% bromophenol blue, Bio Rad) supplemented with β -mercaptoethanol (10%), boiled for 5 minutes and loaded on 12.5% Tris-SDS-acrylamide gel. Proteins were separated by electrophoresis and transferred onto PVDF membranes (BioRad). Membranes were blocked with TBS 1X (NaCl 0.8%, KCl 0.02%, Tris 0.3%, pH 7.4), Tween 0.01%, 5% non-fat milk for 2 hours and incubated with primary antibodies GAD1, GDH, ABAT, (Abcam) overnight at 4°C. Incubation with a secondary antibody (anti-mouse or anti-rabbit, GE Healthcare) was performed for two hours at room temperature. The different proteins were visualized by enhanced chemiluminescence using appropriate kit on a LI-COR Odyssey apparatus. Proteins are quantified using ImageStudio software (Li- COR Odyssey). Tubulin or Actin antibodies (Abcam) were used as loading controls.

Immunocytochemistry. 5 mm-thick slices were cut from formalin-fixed, paraffin-embedded brain biopsy blocks using a Leica RM125 microtome. Immunohistochemistry was carried out using an automated slide immunostainer (Leica Bond Max). Briefly, slices were

deparaffinized prior to antigen exposure pretreatment at 100°C for 20 min in epitope retrieval solution (EDTA-buffer pH8.8). Incubation for 10 minutes with a rabbit monoclonal primary antibody targeting GAD1, ABAT or GDH was followed by an immunoperoxidase-based detection and a hematoxylin counterstain. Staining was examined microscopically and scored semi-quantitatively as follows: 0 = absent, + = mild, ++ = moderate and +++ = strong.

Statistical analysis. Data are presented as means +/- SEM of at least 4 independent experiments. Differences between groups are evaluated by Mann-Whitney statistical test using GraphPad Prism software (GraphPad software, San Diego, USA), asterisk and the sharp sign (* and #) indicates *p-value* <0.05, (** and ##) *p-value* <0.001, (***) *p-value* <0.0001.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from: ""Association Française contre les Myopathies" Mitoscreen 17122, Fondation pour la Recherche Médicale" DPM20121125554, AMMi "Association contre les Maladies Mitochondriales" and supports from the University and Hospital of Angers.

FIGURE LEGENDS

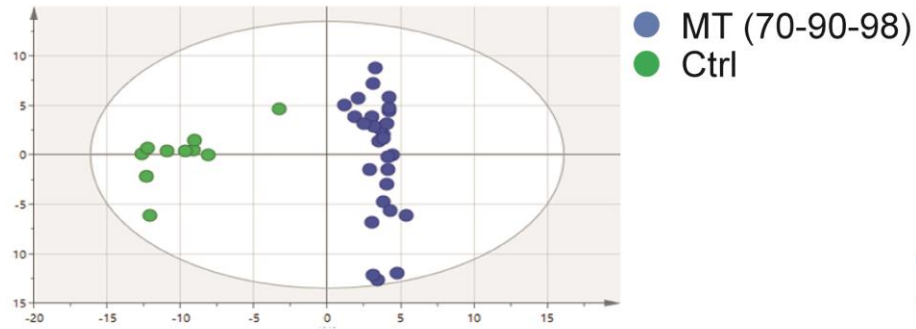
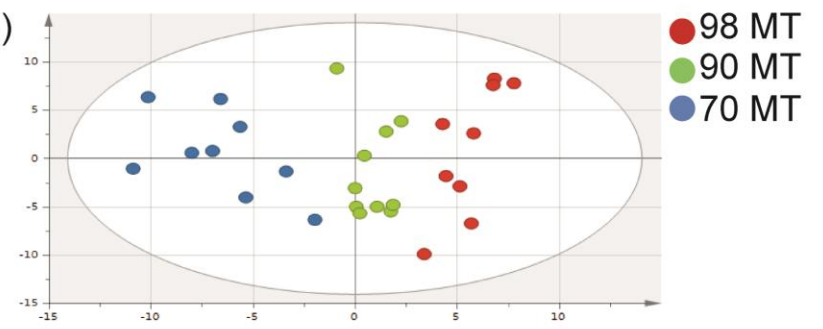
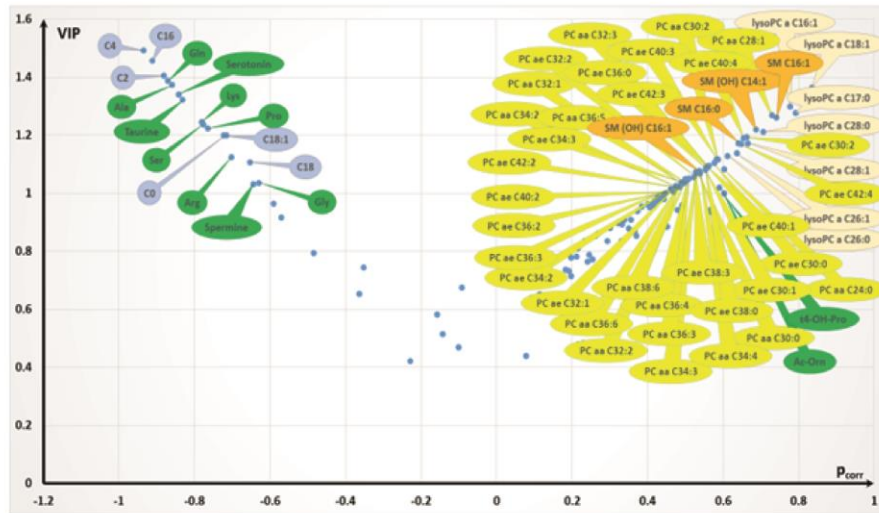
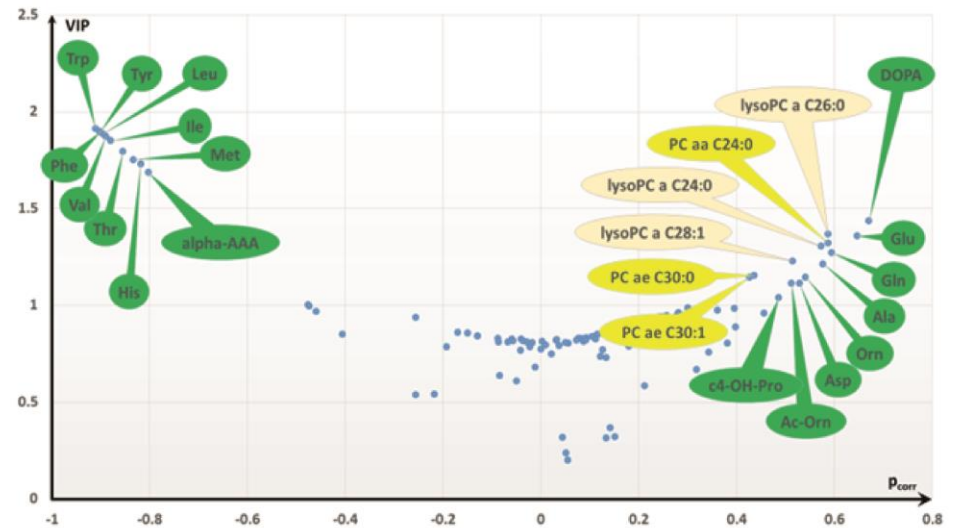
A**B****C****D**

Figure 1. Metabolomic analysis between MELAS and control cells

(A) Unsupervised PCA of metabolomics data from parental control cells (n=10, green dots) and MT cells carrying the MELAS mutation with different MT loads (n=30, blue dots). The first two principal components (PC1 and PC2) explain more than 75% of the total variance. The second component (PC2) clearly separates the two groups of cells. The supervised model has good predictive discriminant properties ($q^2_{\text{cumulated}} = 0.57$) and explains up to 68% of the variance of the y vector.

(B) OPLS model scatter plot of MELAS cells carrying different MT loads. MT cybrids are separated according to the MT load: 70% (blue circles), 90% (green circles) and 98% (red circles) along the predictive latent variable (LVp).

(C) Supervised OPLS-DA models for MT cells carrying different MT loads (from 70%, 90% to 98%) vs parental cells. Only the most discriminating metabolites with high VIP values (>1) and coefficient values (≥ 0.02 or ≤ -0.02) have been labelled. Negative coefficients (left) indicate diminished metabolite concentrations in MT cells versus parental cells, whereas positive coefficients (right) indicate increased metabolite concentrations.

Amino acids and biogenic amines are represented as green bubbles; phosphatidylcholines (PC) as yellow bubbles and lysophosphatidylcholines (lysoPC) as pink bubbles. In PC, “aa” indicates that both moieties at the sn-1 and sn-2 position are fatty acids and bound to the glycerol backbone via ester bonds whilst “ae” denotes that one of the moieties, either in the sn-1 or at sn-2 position is a fatty alcohol and bound via an ether bond. For lysoPCs and PCs, the total number of carbon atoms and double bonds present in lipid fatty acid chain(s) are denoted as “C x:y”, where x is the total carbon number (of both chains for PCs) and y is the total number of double bonds. Ala: Alanine; alpha-AAA: α -Aminoadipic acid; Ac-Orn:

Acetyl-ornithine; Asp: Aspartate; c4-OH-Pro: cis-4-Hydroxyproline; DOPA: 3,4-Dihydroxyphenylalanine; Gln: Glutamine; Glu: Glutamate; His: Histidine; Ile: Isoleucine; Leu: Leucine; Met: Methionine; Orn: Ornithine; Phe: Phenylalanine; Thr: Threonine; Trp: Tryptophane; Tyr: Tyrosine; Val: Valine.

The metabolic signature is characterized by lower levels of 6 metabolites (C0, C2, C4, C16, C18, C18:1) (blue bubbles) and 10 amino acids and amine biogenes (green bubbles) and higher levels of several PC (yellow bubbles) and sphingomyelins (orange bubbles).

Ala: Alanine, Gln: Glutamine, Ser: Serine, Lys: Lysine, Pro: Proline, Gly: Glycine, Arg: Arginine, Taurine, Serotonin and Spermine.

(D) Loadings (p_{corr}) versus vs VIP or “volcano” plot for the OPLS-DA model obtained from the metabolomics analysis of MELAS cells carrying different mutant loads (70%, 90%, 98%). Only the most discriminating metabolites with high VIP values (>1) and coefficient values (≥ 0.02 or ≤ -0.02) have been labelled. VIP: variable importance in the projection. Negative coefficients (left) indicate lower metabolite concentrations in 70% and 90% MT cells whereas positive coefficients (right) indicate metabolites with higher concentrations in 98% MT cells. Amino acids and biogenic amines are represented as green bubbles; phosphatidylcholines (PC) as yellow bubbles and lysophosphatidylcholines (lysoPC) as pink bubbles.

Ala: Alanine; alpha-AAA: α -Aminoadipic acid; Ac-Orn: Acetyl-ornithine; Asp: Aspartate; c4-OH-Pro: cis-4-Hydroxyproline; DOPA: 3,4-Dihydroxyphenylalanine; Gln: Glutamine; Glu: Glutamate; His: Histidine; Ile: Isoleucine; Leu: Leucine; Met: Methionine; Orn: Ornithine; Phe: Phenylalanine; Thr: Threonine; Trp: Tryptophan; Tyr: Tyrosine; Val: Valine.

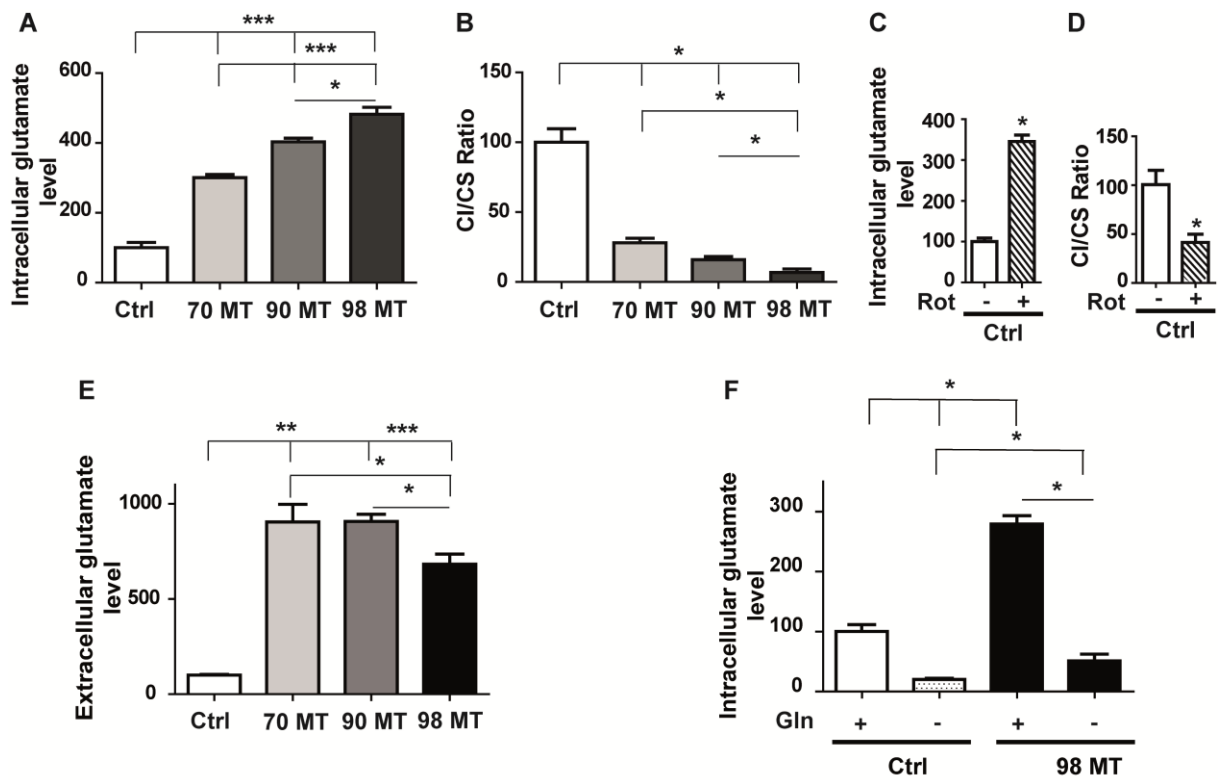


Figure 2. Glutamate concentration is correlated with complex I deficiency in MELAS cells.

(A) Intracellular levels of glutamate in control (Ctrl) and MT cells (70%-90% and 98%). (B) Biochemical assessment of mitochondrial complex I activity in Ctrl and MT cells (70%-90%-98%).

(C) Intracellular level of glutamate in control cells treated with rotenone (200nM) or vehicle during 15 hours.

(D) Biochemical assessment of mitochondrial complex I activity in control cells treated with rotenone or vehicle during 15 hours.

(E) Extracellular glutamate levels. Ctrl: control cells and MT cells carrying different mutant loads (70%-90%-98%).

(F)- Intracellular glutamate levels in Ctrl and 98% MT cells with (+) or without (-) glutamine addition. Results are presented as means \pm SEM relative to control cells of at least 4 independent experiments. Statistical differences are indicated with an asterisk between MT and control cells (* p <0.05; ** p <0.01; *** p <0.001).

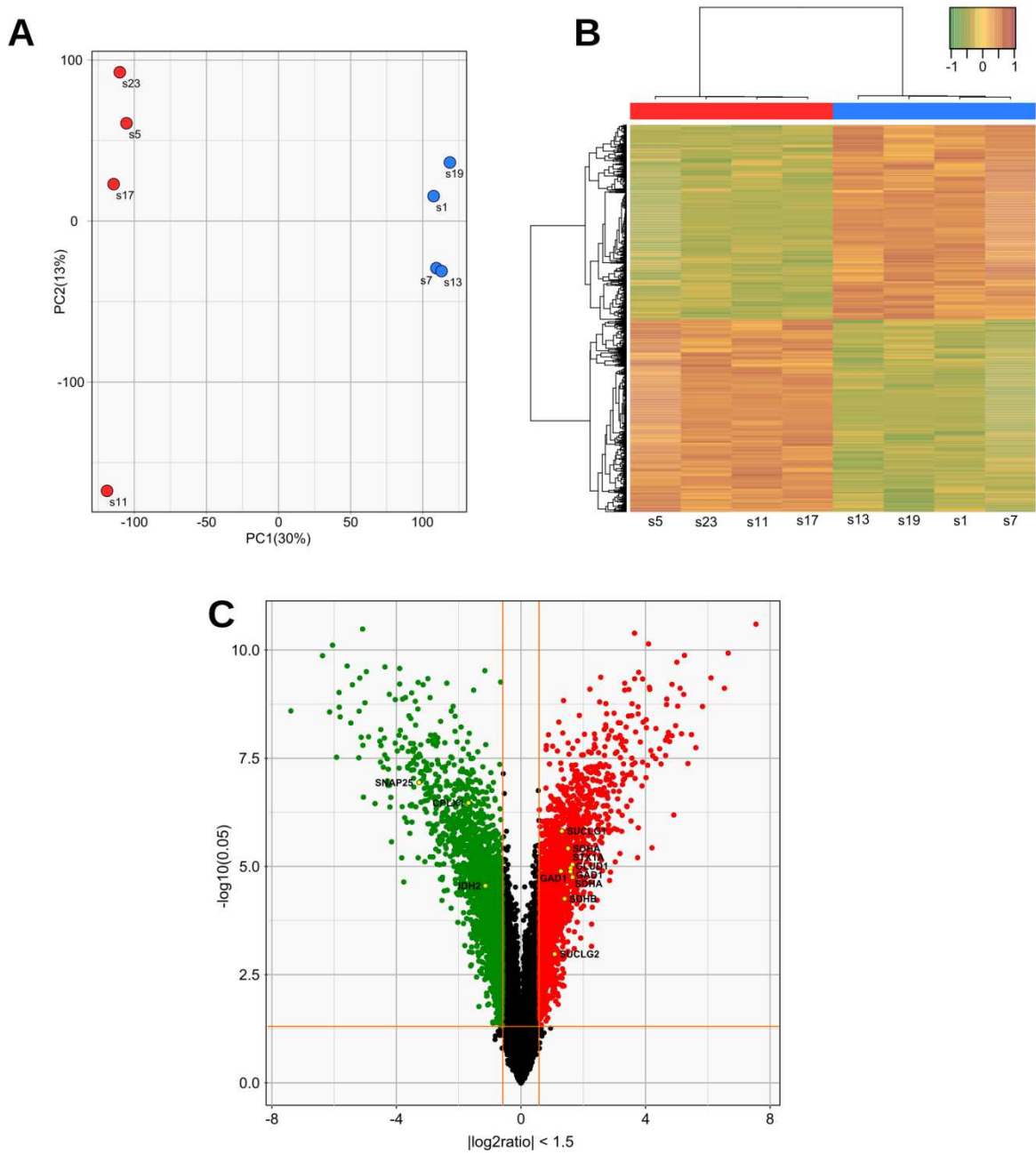


Figure 3. Transcriptional analysis of mutant cells.

(A) Principal component analysis (PCA) and unsupervised clustering of MELAS cells versus controls.

(B) Heatmap diagram of a two-way hierarchical clustering analysis for the 4943 probes showing different expression levels with a $p\text{value} \leq 0.05$ and $\text{abs}(\text{FC}) \geq 1.5$. Red color represents an expression level above the mean, green color represents expression lower than the mean. X-axis represent samples with from the left to the right control cells compared to 98% MT cells ($n=4$) and Y-axis represent Illumina probes.

(C) Volcano plot representation of the differentially expressed genes in a pairwise comparison of control cells compared to 98% MT cells. The significance cut-off was set to a $p\text{value} \leq 0.05$ and $\text{abs}(\text{FC}) \geq 1.5$. The differentially expressed genes annotated as glutamate-glutamine metabolism, GABA and TCA cycle from the REACTOME pathway Database (see Table 1) are labeled with their corresponding gene symbols.

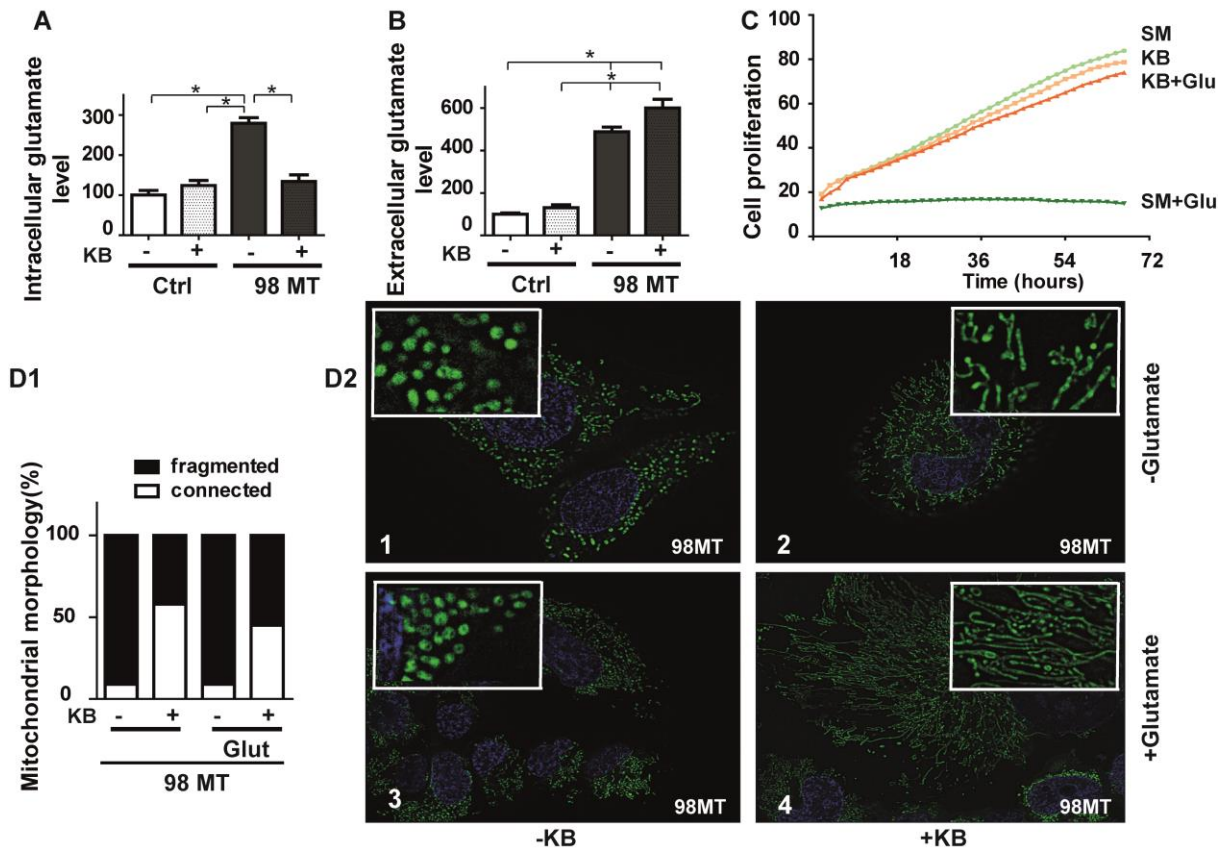


Figure 4. Exposure to ketone bodies restores a normal intracellular glutamate concentration and improves mitochondrial network in MELAS cells.

(A) Intracellular glutamate levels in control and 98% MT cells exposed to (+) or without (-) ketone bodies (KB) for 48 hours.

(B) Extracellular glutamate levels in control and 98% mutant cells exposed to (+) or without (-) KB for 48 hours. Results are from at least four independent experiments, expressed as means \pm SEM relative to control cells. (* $p < 0.05$).

(C) Cellular growth of 98% MT cells cultured in standard medium (SM, light green curve), or exposed to ketone bodies alone (KB, orange curve), or with 50 μ M glutamate (Glu) and ketone bodies (KB+Glu, red curve) or standard medium (SM+Glu, green curve).

(D1) Mitochondrial morphology and percentages of fragmented (black) or connected mitochondria (white) in 98% MT cells without (-) or with KB (+), with or without glutamate (30 μ M).

(D2) Representative images showing the MitoTracker (mitochondrial marker, green fluorescence) and Hoechst (nuclear marker, blue fluorescence) staining of 98% MT cells incubated for 24h in D2-1: standard medium, D2-2: with ketone bodies (KB), D2-3: with glutamate (Glu), D2-4: with Glu and KB.

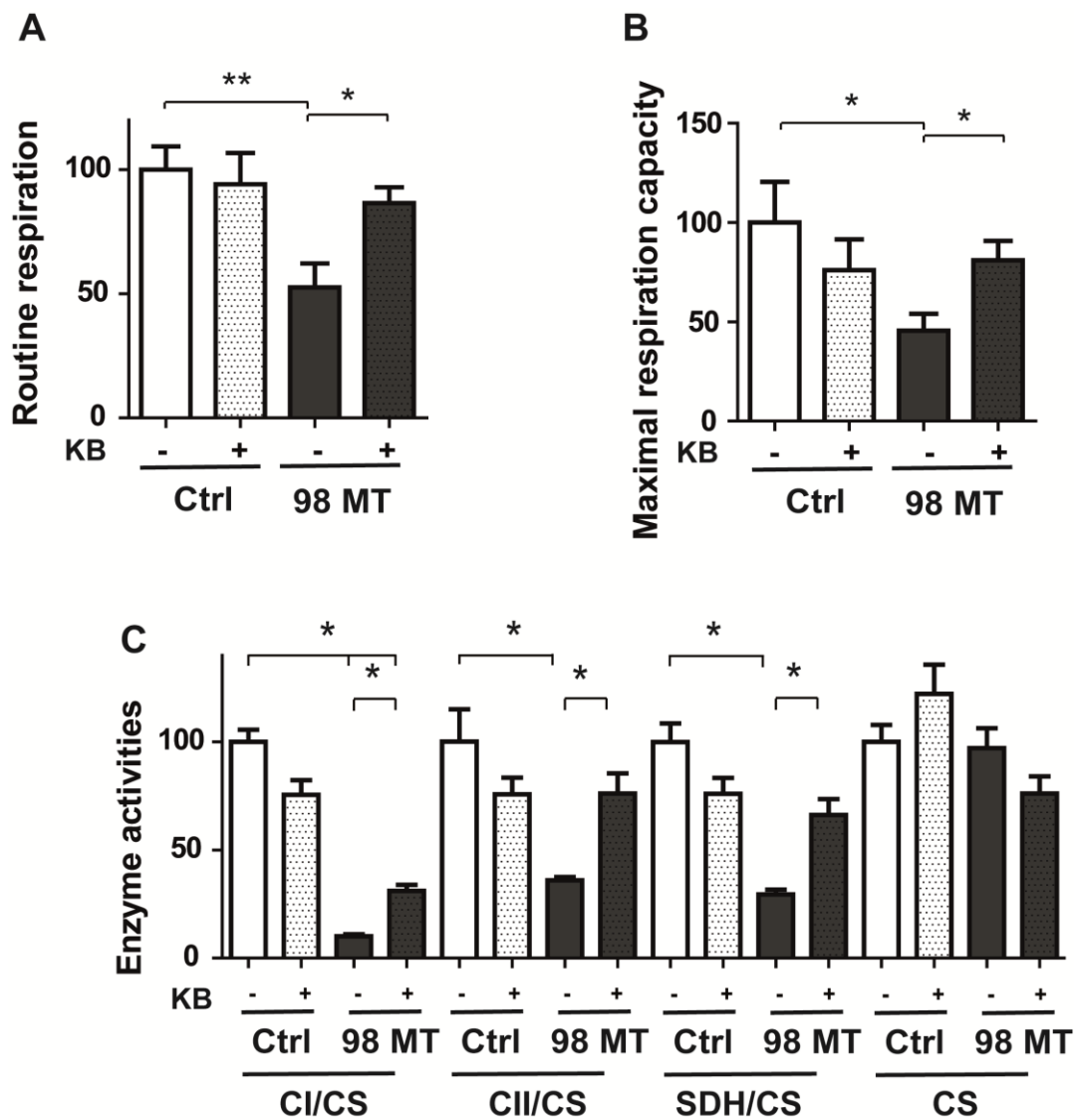


Figure 5. Ketone bodies improve mitochondrial respiration and enzyme activities in MELAS cells.

(A) Oxygraphic measurements of routine (B) and maximal respiration capacity in control and 98% MT cells exposed with or without ketone bodies (KB) for 48h.

(C) Enzyme activities of mitochondrial complex I, II, SDH activities relative to citrate synthase (CS) in control and 98% MT cells exposed with or without KB for 48h. Results are presented as means \pm SEM relative to control cells of at least 4 independent experiments.

Statistical differences are indicated with an asterisk between MT and control cells (* p <0.05;

** p <0.01

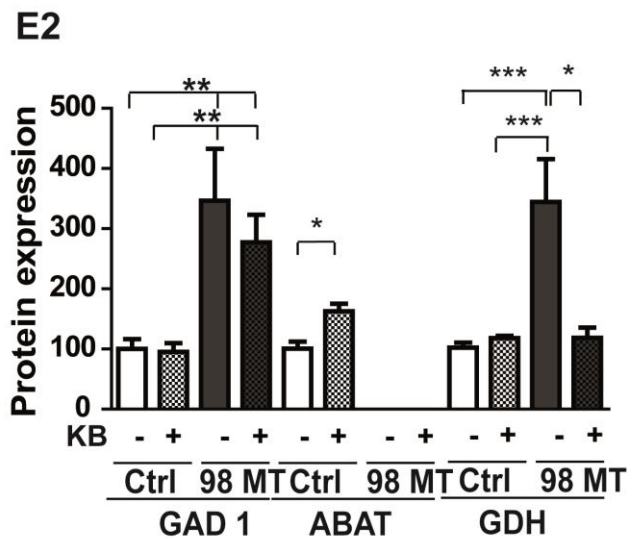
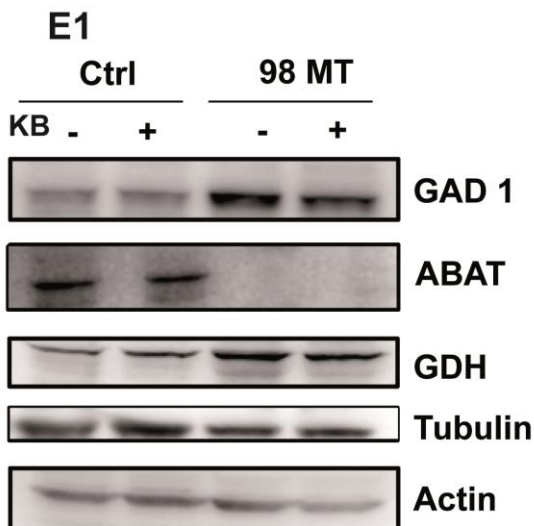
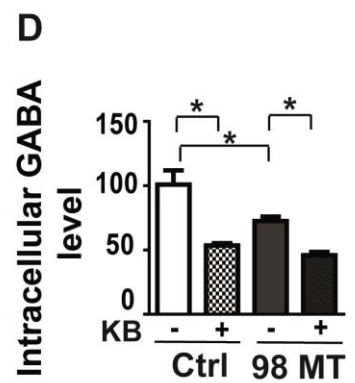
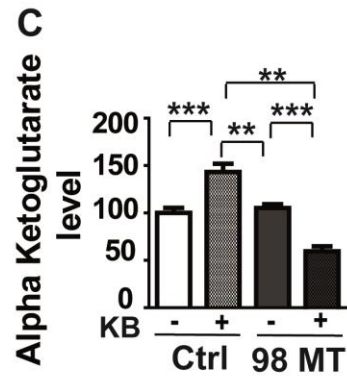
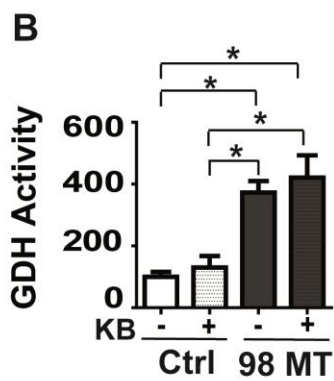
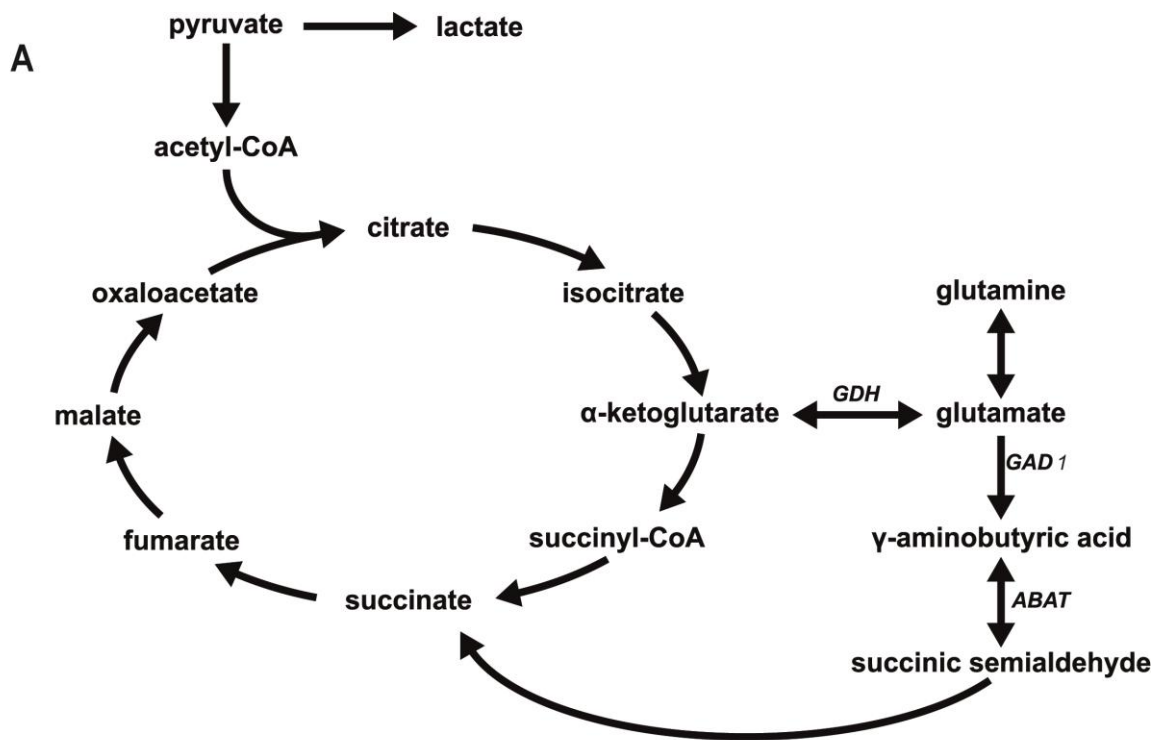


Figure 6. Glutamate/GABA pathways are altered in MELAS cells.

(A) Graphical representation of the glutamate pathway and TCA cycle. GAD1 (glutamate decarboxylase) ABAT (4 aminobutyrate transaminase), GDH (glutamate dehydrogenase). (B) Measurement of GDH activity in Ctrl and 98% MT cells exposed during 48h with (+) or without (-) ketone bodies (KB). (C) Intracellular levels of alpha ketoglutarate concentrations. (D) Intracellular levels of GABA. (E1) Protein expression profiles of GAD1, ABAT and GDH levels in control and 98% MT cells, exposed to (+) or without (-) KB for 48h. (E2) Quantification of the relative protein expression of GAD1, ABAT and GDH in control and 98% MT cells related to tubulin or actin exposed to (+) or without (-) KB. Results are presented as means \pm SEM relative to control cells of at least 4 independent experiments. Statistical differences are indicated with an asterisk between 98% MT and control cells (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

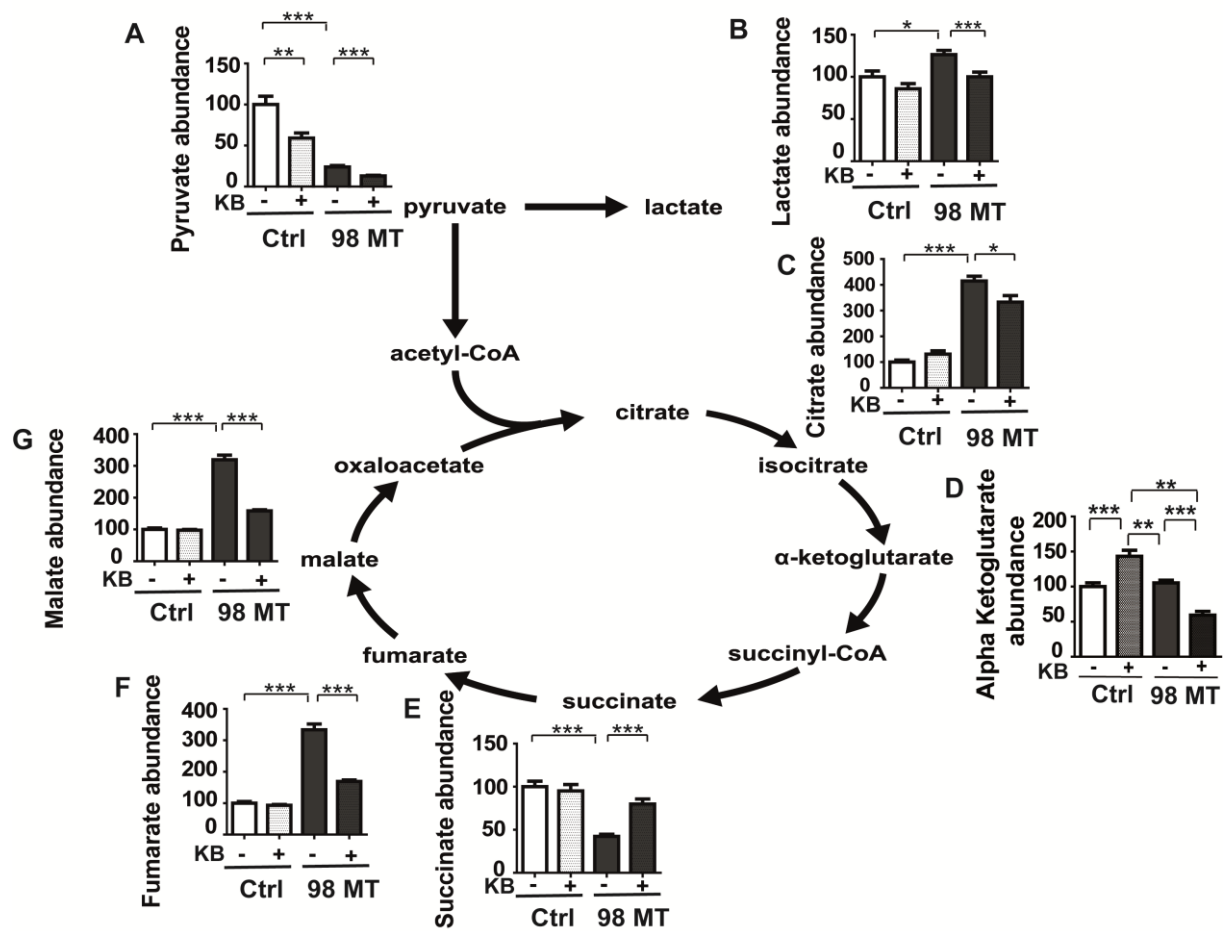
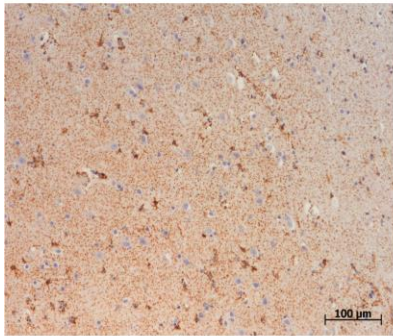
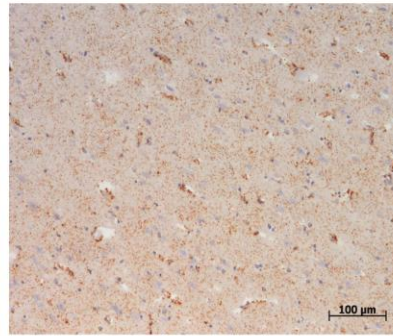


Figure 7. TCA cycle dysfunction in MELAS cells is alleviated by ketone bodies

(A) Pyruvate, (B) lactate, (C) citrate, (D) alpha-ketoglutarate, (E) succinate, (F) fumarate and (G) malate levels in Ctrl and 98% MT cells exposed to (+, dotted line) or without (-, color bar) ketone bodies (KB) for 48h. Results are presented as means \pm SEM relative to control cells of at least 4 independent experiments. Statistical differences are indicated with an asterisk between MT and control cells (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

A1**GDH**

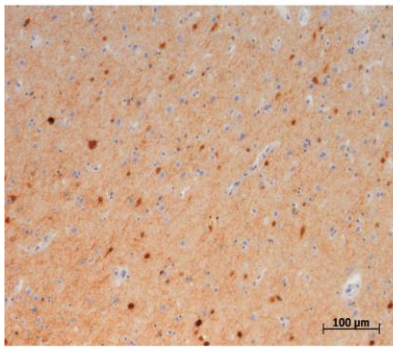
Ctrl



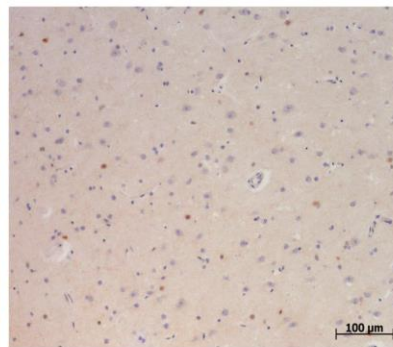
MELAS

A2

GDH	FL	LN	T+SN	C
C1	+	+	+	+
C2	+	+	+	+
C3	+	+	+	+
C4	+	+	+	+
C5	+	+	+	+
MELAS	+	+	+	+

B1**GAD1**

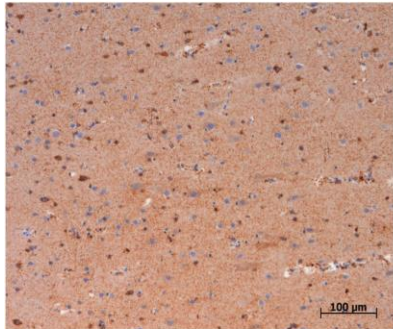
Ctrl



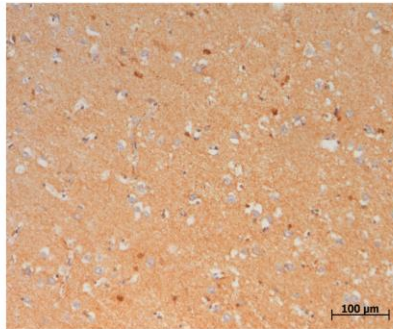
MELAS

B2

GAD	FL	LN	T+SN	C
C1	+	+	+	+
C2	+	+	+	+
C3	+	+	+	+
C4	+	+	+	+
C5	+	+	+	+
MELAS	+	+	+	+

C1**ABAT**

Ctrl



MELAS

C2

ABAT	FL	LN	T+SN	C
C1	+	+	+	+
C2	+	+	+	+
C3	+	+	+	+
C4	+	+	+	+
C5	+	+	+	+
MELAS	+	+	+	+



Figure 8. The glutamate pathway is altered in brain tissue from a MELAS patient.

Immuno-histochemical analyses of paraffin-embedded human frontal brain tissues labeled with GDH (**A1-A2**), GAD1 (**B1-B2**) and ABAT (**C1-C2**) antibodies, from control individuals (left panel) and MELAS patient (right panel). Immuno-histochemical staining intensities of GDH (**A2**), GAD1 (**B2**) and ABAT (**C2**) were examined microscopically and scored semi-quantitatively on 5 control individuals and one MELAS patient by 2 independent analyses, as follow: 0 = absent, + = mild, ++ = moderate and +++ = intense. FL: frontal lobe; LN: lentiform nucleus; T+SN: thalamus + subthalamic nucleus, C: cerebellum.

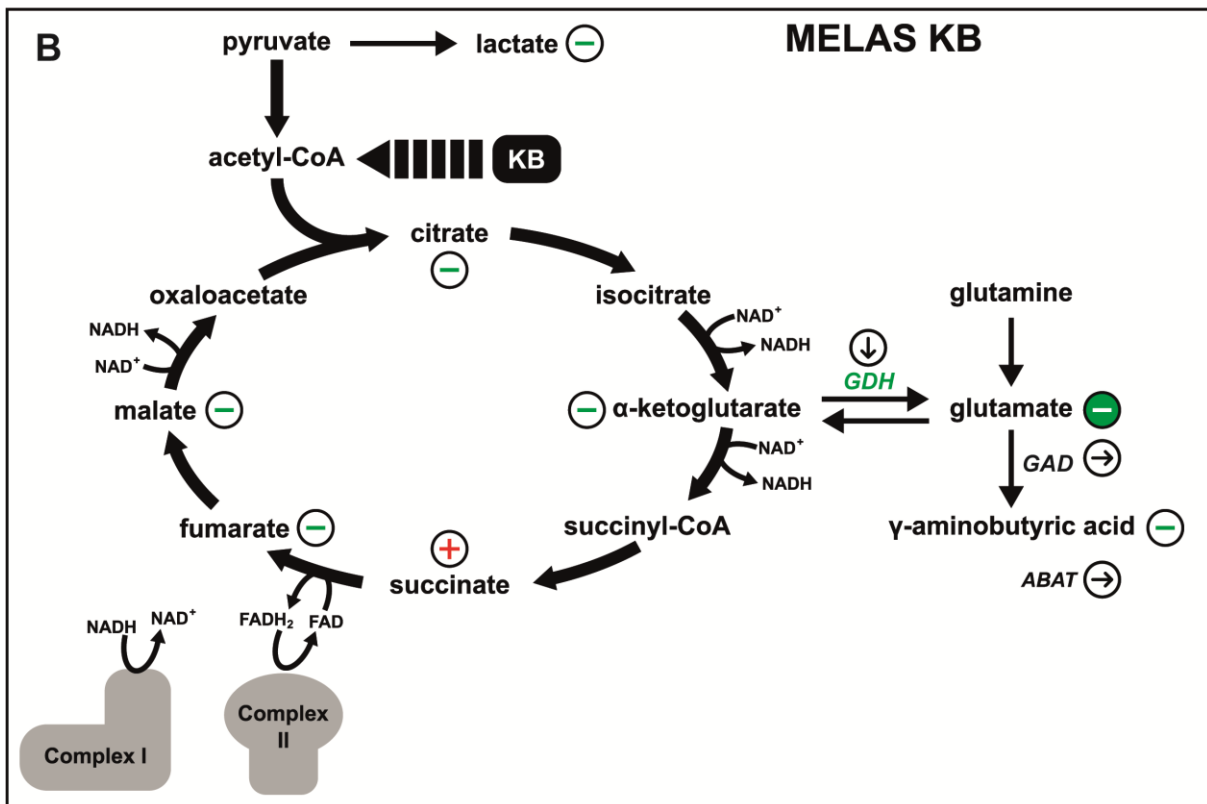
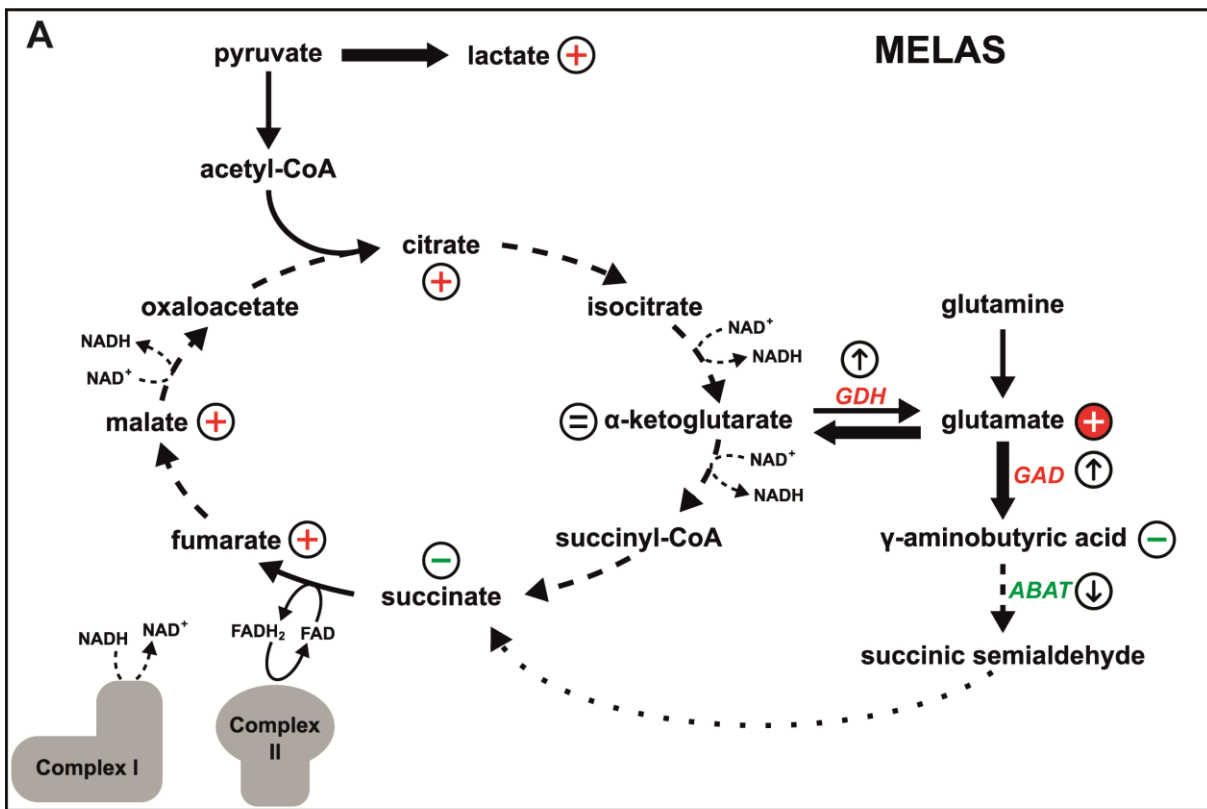


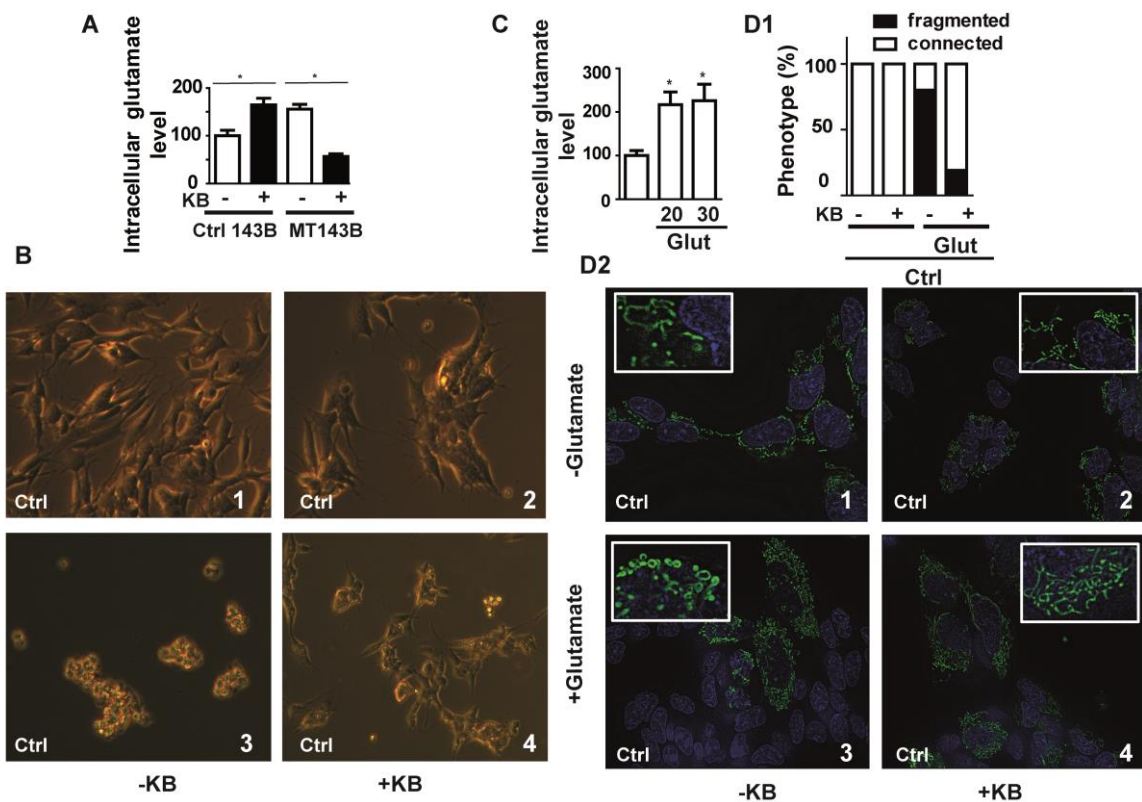
Figure 9. Graphical representation of metabolic pathways in (A) MELAS cells (B) MELAS cells exposed to ketone bodies (KB). +: metabolite increase. -: metabolite reduction, = metabolite unchanged. \uparrow : increased gene expression \downarrow : decreased gene expression.

Pathway ID	Pathway Description	Up-regulated genes	Down-regulated genes	Unchanged genes
R-HSA-8964539	Glutamate and glutamine metabolism	ALDH18A1, GLUD1, GOT2, KYAT1, OAT, RIMKLB	PYCR1	<i>GLS, GLS2, GLUD2, GLUL, PYCR2, PYCR3, RIMKLA</i>
R-HSA-888590	GABA synthesis, release, reuptake and degradation	GAD1, HSPA8, SLC6A1, STX1A, VAMP2	ALDH5A1, CPLX1, SNAP25, SYT1	<i>ABAT, DNAJC5, GAD2, RAB3A, RIMS1, SLC32A1, SLC6A11, SLC6A12, SLC6A13, STXBP1</i>
R-HSA-71403	TCA cycle	CS, DLST, IDH3A, IDH3B, IDH3G, OGDH, SDHA, SDHB, SDHD, SUCLA2, SUCLG1, SUCLG2	FAHD1, IDH2, ME3, NNT, SDHC	<i>ACO2, DLD, FH, MDH2, ME2</i>

Table 1. Functional classification analysis of repressed or overexpressed genes in MELAS cells according to the REACTOME pathway database. The three key clusters (glutamate, GABA, and TCA cycle) from the reactome are shown. Genes belonging to “Glutamate and glutamine metabolism”, “GABA synthesis, release, reuptake and degradation” and “TCA cycle” were classified in three groups. The up-regulated genes with a pvalue ≤ 0.05 and FC ≥ 1.3 , down-regulated genes with a pvalue ≤ 0.05 and FC ≤ -1.3 and unchanged gene expression if the pvalue > 0.05 and/or abs (FC) < 1.3 . Up-regulated and down regulated genes from these pathways with a fold change over 1.5 are indicated in bold.

Amino acids	Ctrls	MELAS
Glutamate	239+/-15.5	417
Glutamine	246.5+/-0.7	356
Proline	29.7+/-0.42	60.1
Arginine	21.8+/-0.28	52.9
Histidine	16.35+/-2.19	25.4
Ornithine	10.75+/-0.07	9.9
Isoleucine	16.1+/-1.7	40.5
Methionine	9.64+/-1.64	25.5
Threonine	25.15+/-1.62	44
Valine	25.9+/-2.54	62.3
Alanine	99.25+/-3.9	168
Aspartate	133+/-9.89	108
GABA	93.25+/-7.2	66.9

Table 2. Mass spectrometry quantification of amino acids in brain autopsic tissues from a MELAS patient and controls. Controls: Ctrls; Values in controls (n= 2) are expressed as mean



SUPPLEMENTAL FIGURE LEGENDS

Figure S1. (A)- Intracellular levels of glutamate in 143B osteosarcoma cybrid cells. Control (Ctrl) cells and MT cells carrying 99% mutant load of the MELAS mutation. Results are presented as means \pm SEM relative to control cells of at least 4 independent experiments. Statistical differences are indicated with an asterisk between MT and control cells (* p <0.05). (B)- Glutamate impact on mitochondrial morphology in 143B cybrid control cells. Control cells with standard medium (1), with ketone bodies (KB) medium (2), with standard medium + 30mM glutamate, with KB + 30mM glutamate (4). (C)- Intracellular level of glutamate in control cybrid cells exposed to glutamate 20 and 30 mM for 24h. (D)- Glutamate impact on

mitochondrial network structure in control cells, in the presence or absence of ketone bodies (KB). Results are presented as means \pm SEM relative to control cells of at least 4 independent experiments. Statistical differences are indicated with an asterisk between MT and control cells (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Representative images of cells stained with MitoTracker (green) and Hoescht-DNA staining (blue) incubated for 24h in standard medium (1), with KB (2), with 30mM of glutamate (3), or with KB + 30mM of glutamate (4).

Data submission

All data have been submitted on GEO NCBI site with this accession number GSE

REFERENCES

1. Wallace DC, Fan W, Procaccio V. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu. Rev. Pathol.* 2010;5:297–348.
2. Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu. Rev. Genet.* 2005;39:359–407.
3. Wallace DC. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu. Rev. Biochem.* 2007;76:781–821.
4. Wallace DC, Fan W, Procaccio V. Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu. Rev. Pathol.* 2010;5:297–348.
5. Goto Y, Nonaka I, Horai S. A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* 1990;348(6302):651–653.
6. DiMauro S, Hirano M. MELAS [Internet]. In: Pagon RA et al eds. *GeneReviews*(®). Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993:
7. El-Hattab AW, Adesina AM, Jones J, Scaglia F. MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol. Genet. Metab.* 2015;116(1–2):4–12.
8. Uusimaa J et al. Prevalence, segregation, and phenotype of the mitochondrial DNA 3243A>G mutation in children. *Ann. Neurol.* 2007;62(3):278–287.
9. Chomyn A et al. MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of

upstream and downstream mature transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1992;89(10):4221–4225.

10. Kirino Y et al. Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004;101(42):15070–15075.

11. Sproule DM, Kaufmann P. Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: basic concepts, clinical phenotype, and therapeutic management of MELAS syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008;1142:133–158.

12. Finsterer J. Genetic, pathogenetic, and phenotypic implications of the mitochondrial A3243G tRNA^{Leu}(UUR) mutation. *Acta Neurol. Scand.* 2007;116(1):1–14.

13. Koopman WJH, Willems PHGM, Smeitink JAM. Monogenic mitochondrial disorders. *N. Engl. J. Med.* 2012;366(12):1132–1141.

14. Dunbar DR, Moonie PA, Zeviani M, Holt IJ. Complex I deficiency is associated with 3243G:C mitochondrial DNA in osteosarcoma cell cybrids. *Hum. Mol. Genet.* 1996;5(1):123–129.

15. Majamaa K, Rusanen H, Remes A, Hassinen IE. Metabolic interventions against complex I deficiency in MELAS syndrome. *Mol. Cell. Biochem.* 1997;174(1–2):291–296.

16. Hämäläinen RH et al. Tissue- and cell-type-specific manifestations of heteroplasmic mtDNA 3243A>G mutation in human induced pluripotent stem cell-derived disease model. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2013;110(38):E3622–3630.

17. Shanske S et al. The G13513A mutation in the ND5 gene of mitochondrial DNA as a common cause of MELAS or Leigh syndrome: evidence from 12 cases. *Arch. Neurol.* 2008;65(3):368–372.
18. Desquiret-Dumas V et al. Metabolically induced heteroplasmy shifting and l-arginine treatment reduce the energetic defect in a neuronal-like model of MELAS. *Biochim. Biophys. Acta* 2012;1822(6):1019–1029.
19. Geffroy G et al. The accumulation of assembly intermediates of the mitochondrial complex I matrix arm is reduced by limiting glucose uptake in a neuronal-like model of MELAS syndrome. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2018;1864(5 Pt A):1596–1608.
20. Koga Y et al. Molecular pathology of MELAS and L-arginine effects. *Biochim. Biophys. Acta* 2012;1820(5):608–614.
21. Bough KJ, Rho JM. Anticonvulsant mechanisms of the ketogenic diet. *Epilepsia* 2007;48(1):43–58.
22. Kang H-C, Lee Y-M, Kim HD. Mitochondrial disease and epilepsy. *Brain Dev.* 2013;35(8):757–761.
23. Steriade C, Andrade DM, Faghfoury H, Tarnopolsky MA, Tai P. Mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) may respond to adjunctive ketogenic diet. *Pediatr. Neurol.* 2014;50(5):498–502.
24. Frey S et al. The addition of ketone bodies alleviates mitochondrial dysfunction by restoring complex I assembly in a MELAS cellular model. *Biochim. Biophys. Acta* 2017;1863(1):284–291.

25. Sasarman F, Antonicka H, Shoubridge EA. The A3243G tRNA^{Leu}(UUR) MELAS mutation causes amino acid misincorporation and a combined respiratory chain assembly defect partially suppressed by overexpression of EFTu and EFG2 [Internet]. *Hum. Mol. Genet.* 2008;17(23):3697–3707.
26. Dunbar DR, Moonie PA, Zeviani M, Holt IJ. Complex I deficiency is associated with 3243G:C mitochondrial DNA in osteosarcoma cell cybrids. *Hum. Mol. Genet.* 1996;5(1):123–129.
27. Koga Y et al. L-arginine improves the symptoms of strokelike episodes in MELAS. *Neurology* 2005;64(4):710–712.
28. Rikimaru M et al. Taurine ameliorates impaired the mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. *Intern. Med. Tokyo Jpn.* 2012;51(24):3351–3357.
29. Jassal B et al. The reactome pathway knowledgebase [Internet]. *Nucleic Acids Res.* 2020;48(D1):D498–D503.
30. Skytt DM et al. siRNA knock down of glutamate dehydrogenase in astrocytes affects glutamate metabolism leading to extensive accumulation of the neuroactive amino acids glutamate and aspartate [Internet]. *Neurochem. Int.* 2012;61(4):490–497.
31. Besse A et al. The GABA Transaminase, ABAT, Is Essential for Mitochondrial Nucleoside Metabolism [Internet]. *Cell Metab.* 2015;21(3):417–427.
32. Plaitakis A, Kalef-Ezra E, Kotzamani D, Zaganas I, Spanaki C. The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease [Internet]. *Biology* 2017;6(1). doi:10.3390/biology6010011

33. Owen OE, Kalhan SC, Hanson RW. The key role of anaplerosis and cataplerosis for citric acid cycle function. *J. Biol. Chem.* 2002;277(34):30409–30412.
34. Khan S, Ince-Dunn G, Suomalainen A, Elo LL. Integrative omics approaches provide biological and clinical insights: examples from mitochondrial diseases [Internet]. *J. Clin. Invest.* 2020;130(1):20–28.
35. Rahman J, Rahman S. Mitochondrial medicine in the omics era. *Lancet Lond. Engl.* 2018;391(10139):2560–2574.
36. Ahola-Erkkilä S et al. Ketogenic diet slows down mitochondrial myopathy progression in mice [Internet]. *Hum. Mol. Genet.* 2010;19(10):1974–1984.
37. Castillo J, Dávalos A, Noya M. Progression of ischaemic stroke and excitotoxic aminoacids. *Lancet Lond. Engl.* 1997;349(9045):79–83.
38. DiFrancesco JC et al. MELAS mitochondrial DNA mutation A3243G reduces glutamate transport in cybrids cell lines. *Exp. Neurol.* 2008;212(1):152–156.
39. Sun Z-W, Zhang L, Zhu S-J, Chen W-C, Mei B. Excitotoxicity effects of glutamate on human neuroblastoma SH-SY5Y cells via oxidative damage. *Neurosci. Bull.* 2010;26(1):8–16.
40. Sun X, Shi X, Lu L, Jiang Y, Liu B. Stimulus-dependent neuronal cell responses in SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Mol. Med. Rep.* 2016;13(3):2215–2220.
41. Chen Q et al. Rewiring of Glutamine Metabolism Is a Bioenergetic Adaptation of Human Cells with Mitochondrial DNA Mutations. *Cell Metab.* 2018;27(5):1007-1025.e5.

42. Buzkova J et al. Metabolomes of mitochondrial diseases and inclusion body myositis patients: treatment targets and biomarkers. *EMBO Mol. Med.* 2018;10(12).
doi:10.15252/emmm.201809091
43. Picard M et al. Progressive increase in mtDNA 3243A>G heteroplasmy causes abrupt transcriptional reprogramming [Internet]. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2014;111(38):E4033–E4042.
44. Gibson GE, Starkov A, Blass JP, Ratan RR, Beal MF. Cause and consequence: mitochondrial dysfunction initiates and propagates neuronal dysfunction, neuronal death and behavioral abnormalities in age-associated neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 2010;1802(1):122–134.
45. Johnson SC et al. Regional metabolic signatures in the Ndufs4(KO) mouse brain implicate defective glutamate/ α -ketoglutarate metabolism in mitochondrial disease. *Mol. Genet. Metab.* 2020;130(2):118–132.
46. Steele H et al. Metabolic effects of bezafibrate in mitochondrial disease [Internet]. *EMBO Mol. Med.* 2020;12(3):e11589.
47. Codron P et al. Primary fibroblasts derived from sporadic amyotrophic lateral sclerosis patients do not show ALS cytological lesions. *Amyotroph. Lateral Scler. Front. Degener.* 2018;19(5–6):446–456.
48. Chao de la Barca JM et al. The metabolomic signature of Leber’s hereditary optic neuropathy reveals endoplasmic reticulum stress. *Brain* 2016;139(11):2864–2876.

49. Bocca C et al. The Metabolomic Bioenergetic Signature of Opa1-Disrupted Mouse Embryonic Fibroblasts Highlights Aspartate Deficiency [Internet]. *Sci. Rep.* 2018;8(1). doi:10.1038/s41598-018-29972-9
50. Veyrat-Durebex C et al. Metabolomics and Lipidomics Profiling of a Combined Mitochondrial Plus Endoplasmic Reticulum Fraction of Human Fibroblasts: A Robust Tool for Clinical Studies. *J. Proteome Res.* 2018;17(1):745–750.
51. Veyrat-Durebex C et al. Metabo-lipidomics of Fibroblasts and Mitochondrial-Endoplasmic Reticulum Extracts from ALS Patients Shows Alterations in Purine, Pyrimidine, Energetic, and Phospholipid Metabolisms [Internet]. *Mol. Neurobiol.* [published online ahead of print: January 24, 2019]; doi:10.1007/s12035-019-1484-7
52. Sumner LW et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis: Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). *Metabolomics* 2007;3(3):211–221.
53. Smith ML, Baggerly KA, Bengtsson H, Ritchie ME, Hansen KD. illuminaio: An open source IDAT parsing tool for Illumina microarrays. *F1000Research* 2013;2:264.
54. Ritchie ME et al. limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(7):e47.
55. Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2010;26(1):139–140.

56. Subramanian A et al. Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles [Internet]. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2005;102(43):15545–15550.

3.3. Résultats/ Discussion et Perspectives

3.3.1. Mise en évidence d'une signature métabolique pour les cybrides MELAS

Dans un premier temps nous avons réalisé une étude métabolomique ciblée de 188 métabolites afin de mettre en évidence des variations entre les cybrides contrôles et les cybrides porteurs de différents taux de la mutation MELAS (70-90 et 98%). Nous nous sommes concentrés sur les changements visibles au niveau des acides aminés. L'étude en composante principale non supervisée (PCA) a séparé très clairement nos populations en deux groupes, les cellules contrôles et les cellules mutantes à différents taux de mutation (70-90 et 98%). L'analyse des différents métabolites entre ces deux populations montre une diminution de plusieurs acides aminés dont l'alanine, la glutamine, la serine, la lysine, la proline, la glycine, la serotonine, la spermine, l'arginine et la taurine dans la population mutante par rapport aux contrôles. La comparaison entre les différents mutants a permis de montrer une séparation des trois lignées mutantes (70, 90 et 98%) avec une augmentation de la L-DOPA, l'ornithine, l'aspartate, l'alanine, la glutamine et le glutamate chez les 98% mutant par rapports aux autres mutants (70% et 90%). La diminution de la taurine et de l'arginine identifiée chez les mutants nous a conforté dans nos résultats car ces deux métabolites sont effectivement connus pour jouer un rôle dans le syndrome MELAS et leurs effets bénéfiques sur le plan thérapeutique a déjà été démontré (Desquiret-Dumas et al., 2012; Koga et al., 2005, 2012; Ohsawa et al., 2019; Rikimaru et al., 2012). L'analyse des métabolites qui diffèrent chez les mutants (70-90 et 98%) a également révélé une augmentation de la L-DOPA dans les cybrides 98%, or ce métabolite est connu pour induire une toxicité sur les neurones (Chan et al., 2012). Dans une étude d'exposition de L-DOPA sur des cellules SHSY-5Y, l'équipe de *Giannopoulos et al* a montré une diminution de la viabilité cellulaire, et une augmentation de l'ubiquitination. Au niveau de la morphologie mitochondriale ils ont observé une augmentation de la fragmentation mitochondriale indépendante du stress oxydant. En ce qui concerne la fonction mitochondriale, ils ont mis en évidence une diminution de la respiration maximale (28%) et une diminution de la respiration relative à la production d'ATP (48%) (Giannopoulos et al., 2019). De plus l'administration de L-DOPA entraîne une diminution spécifique de l'activité du complexe I de la chaîne mitochondriale du cerveau de rat (Przedborski et al., 1993). Toutes ces données suggèrent un rôle majeur de ce métabolite dans le syndrome MELAS.

Nous avons également retrouvé une augmentation de l'aspartate, de la glutamine, de l'alanine et glutamate dans les cybrides mutants 98%. Tous ces acides aminés jouent un rôle dans le métabolisme du glutamate (cf figure 24). De plus comme précédemment souligné, la toxicité du glutamate est retrouvée dans de nombreuses pathologies neurodégénératives (Lewerenz and Maher, 2015). Notamment le glutamate serait un métabolite majeur dans l'apparition des crises épileptiques (van Gelder et al., 1980; Janjua et al., 1992). Effectivement, 71 à 96% des patients MELAS présentent des crises épileptiques (Finsterer, 2009; Pavlakis et al., 1984b). Compte tenu de l'importance de ce métabolite pour le syndrome MELAS, nous avons décidé d'étudier plus spécifiquement le glutamate et ses voies métaboliques.

3.3.2. La concentration de glutamate est augmentée en lien avec le déficit du complexe I dans les cybrides MELAS

Afin de confirmer l'augmentation de la concentration de glutamate dans les cybrides mutants, nous avons dosé spécifiquement celui-ci à la fois en intracellulaire et en extracellulaire. De fortes concentrations de glutamate sont retrouvées en extra et intracellulaire chez les mutants par rapport aux cellules contrôles. L'augmentation des concentrations intracellulaires de glutamate est parfaitement corrélée avec le degré d'hétéroplasmie de la mutation m.3243A>G. En parallèle nous avons trouvé des concentrations extracellulaires de glutamate plus importantes dans les cybrides à des taux intermédiaires 70% et 90% par rapport aux cybrides 98%. Nous pouvons ici proposer comme hypothèse un défaut de transport du glutamate. En effet comme mentionné précédemment, le transporteur EAAC1 participe à la recapture du glutamate au sein des neurones (Kugler and Schmitt, 1999). Une étude réalisée sur des rats mimant un modèle d'épilepsie après injection systémique d'acide kainique (KA; analogue du glutamate) montre une internalisation transitoire du transporteur EAAC1 suite à l'injection de KA. Cela suggère que cette internalisation empêcherait l'absorption excessive de glutamate lors de la crise épileptique, permettant ainsi une meilleure protection des neurones à la toxicité du glutamate. (Furuta et al., 2003). Nous pouvons par ce fait émettre l'hypothèse d'un défaut d'internalisation du transporteur du glutamate pour les cellules mutantes 98% entraînant donc des concentrations plus faibles de glutamate extracellulaire par rapport aux 70 et 90% mutants, responsables de l'augmentation des concentrations intracellulaires retrouvées dans les cellules mutantes 98% (Figures 2A-2E). De plus dans leur étude *DiFrancesco et al* établissent un lien entre le défaut d'absorption du glutamate extracellulaire et les transporteurs EAAT dans des cybrides 143B MELAS à haut taux de mutation m.3243A>G. Afin d'établir un lien potentiel entre le défaut de production d'énergie rencontré dans la mutation MELAS et le défaut d'absorption de glutamate, ils ont traité les cellules contrôles avec 100nm de roténone (inhibiteur du complexe I) pendant 15h et regardé le taux de glutamate par rapport aux cellules non traitées. Il y a une réduction de plus de 48% d'absorption de glutamate dans les cellules mimant un déficit de complexe I (traitement roténone) par rapport aux cellules non traitées. Preuve ici de l'implication du défaut du complexe I de la chaîne mitochondriale de MELAS dans le défaut de transport du glutamate (DiFrancesco et al., 2008). Ces deux études nous apportent deux informations majeures, d'une part il y a un défaut d'absorption du glutamate en fonction du déficit énergétique de la cellule (expliquant ainsi les concentrations extracellulaires importantes de glutamate pour les mutants). De plus un défaut d'internalisation de ce transporteur pourrait également participer aux différences de concentrations extracellulaires de glutamate observées entre les mutants (moins de glutamate extracellulaire pour les 98% par rapport aux 70% et 90%). Une étude plus approfondie de ce transporteur semble donc pertinente pour comprendre les variations de glutamate extracellulaire retrouvées chez les mutants. En parallèle à l'étude de *DiFrancesco*, nous avons également voulu savoir s'il existait un lien entre le déficit du complexe I de nos cybrides MELAS et une augmentation des concentrations de glutamate intracellulaire. Nous avons retrouvé une diminution de l'activité du complexe I suivant le degré d'hétéroplasmie de la mutation m.3243A>G pour les cellules cybrides 70, 90 et 98% avec une diminution de l'activité de 72, 84 et 93 % respectivement.

Le traitement par la roténone des cybrides contrôles a diminué l'activité du complexe I de plus de 59% et en parallèle augmenté de plus de 245% le glutamate intracellulaire par rapport aux cellules non traitées. Nous avons donc montré un lien entre l'augmentation de la concentration de glutamate intracellulaire retrouvé dans les cybrides MELAS et le déficit de l'activité du complexe I. Cette augmentation de la concentration de glutamate a également été retrouvée pour les cybrides 143B (ostéosarcome) MELAS, preuve ici que ce mécanisme ne serait pas spécifique à la lignée neuronale renforçant l'idée du rôle clé du glutamate comme substrat énergétique.

3.3.3. Les corps cétoniques restaurent à la fois une concentration intracellulaire normale de glutamate mais également améliorent les fonctions mitochondriales et le réseau mitochondrial des cybrides MELAS

Le traitement de 48h avec les corps cétoniques des cybrides mutants m.3243A>G 143B diminue considérablement la concentration intracellulaire de glutamate. Fait intéressant nous n'avons pas retrouvé de différences au niveau des concentrations intracellulaires de glutamate pour les cybrides contrôles provenant de la lignée neuronale SHSY-5Y, à la différence des cybrides contrôles provenant de la lignée 143B avec une augmentation consécutive à l'exposition des corps cétoniques. Nous pouvons ici émettre l'hypothèse que cette différence est due aux différences d'expression de certaines protéines et fonction du type cellulaire. En effet dans la lignée ostéosarcome 143B les différents types de transporteurs du glutamate de la famille des EAAT sont présents, mais le niveau d'expression va varier en fonction du type cellulaire avec une expression prédominante dans la lignée neuronale (Beretta et al., 2004). Ces transporteurs jouent un rôle dans la recapture du glutamate lors de la neurotransmission. De plus la protéine GAD1 (glutamate décarboxylase 1) permettant la conversion du glutamate en GABA est quant à elle exclusivement exprimée dans les tissus neuronaux. Nous montrons donc ici que le glutamate est impliqué dans différents types cellulaires pour le syndrome MELAS, que les corps cétoniques permettent une réduction du glutamate chez les mutants mais que le mécanisme de cette réduction est probablement fonction du type cellulaire.

Dans la suite de cette étude nous nous sommes intéressés à la toxicité du glutamate en lien direct avec la morphologie et la fonction mitochondriale. L'exposition de cellules murines neuronales (HT22) à des concentrations fortes en glutamate entraîne une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale, une surproduction de ROS, une perturbation de la dynamique mitochondriale vers la fission et une activation de l'autophagie (Kumari et al., 2012). Dans notre travail, l'exposition des cybrides contrôles à du glutamate pour des concentrations toxiques (30 μ M) entraîne une réduction de la croissance cellulaire et une fragmentation mitochondriale. Les mitochondries des cybrides mutants m.3243A>G sont majoritairement fragmentées et une exposition au glutamate ne change pas la morphologie mitochondriale. Par contre, le traitement avec les corps cétoniques améliore la morphologie mitochondriale pour les cybrides mutés MELAS, avec une augmentation de plus de 40% de mitochondries connectées. Le traitement combiné de corps cétoniques et de glutamate à des doses toxiques permet de protéger les cellules cybrides contrôles et mutantes de la fragmentation

mitochondriale. Nous avons ici montré que les corps cétoniques protègent de la fission mitochondriale induite par la toxicité du glutamate.

Au niveau des fonctions mitochondriales, nous avons retrouvé une diminution de la respiration de routine et de celle liée à la synthèse d'ATP, mais également une diminution de l'activité du complexe I dans les cybrides mutants (Desquiret-Dumas et al., 2012; Frey et al., 2017). Nous avons également mis en évidence une diminution de l'activité du complexe II ainsi que de la SDH dans les cybrides mutants. Le traitement avec les corps cétoniques durant 48h, a permis une augmentation de la respiration de routine, une augmentation de la respiration liée à la synthèse d'ATP, ainsi qu'une augmentation des activités des complexes I et II et de la SDH. Les corps cétoniques restaurent les fonctions mitochondriales pour les cellules mutantes MELAS.

3.3.4. Altération des voies du métabolisme impliquant le glutamate dans le syndrome MELAS

a) Exemple des cybrides MELAS

Nous nous sommes intéressés à deux voies de conversion possible du glutamate. Le glutamate par une réaction de désamination, peut être converti en α -cétoglutarate, via la GDH, et ainsi alimenter le CK. Le glutamate peut également être décarboxylé en GABA (neurotransmetteur inhibiteur) via la glutamate décarboxylase 1 (GAD1). Cette enzyme est exprimée sous deux isoformes GAD65 et GAD67 codées à partir de deux gènes paralogues *gad2* et *gad1* respectivement (Erlander et al., 1991), exprimés au niveau des neurones GABAergiques du cerveau (Martin and Rimvall, 1993a). Ces enzymes nécessitent la liaison à un cofacteur, la pyridoxalphosphate (PLP), pour être activées (Denner and Wu, 1985). La majorité du GABA (70%) produit dans le cerveau provient de GAD67, constitutivement sous forme active, et moins de 10% de la forme active de GAD65 est retrouvée (Battaglioli et al., 2003). Le GABA produit peut soit être excrété, soit entrer dans la voie GABA shunt. Le catabolisme du GABA se produit dans la matrice mitochondriale, la GABA Transaminase (ABAT) permet la conversion en semialdéhyde succinique (SSA) qui est à son tour convertie en succinate par la déshydrogénase succinique (SSADH). Le succinate agit à la fois comme un donneur d'électrons à la chaîne mitochondriale et comme un composant du CK. GAD67 contribue principalement au GABA shunt (Martin and Rimvall, 1993b). En effet de forts niveaux d'ARNm de GAD67 sont retrouvés dans des structures contenant des niveaux élevés en fer qui est un cofacteur nécessaire à l'activité des enzymes constituant le GABA shunt (ABAT-SSADH) (Li, 1998; Taneja et al., 1986).

L'étude de la première voie de conversion du glutamate par la désamination de celui-ci en α -cétoglutarate via la GDH, nous montre que l'expression génique tout comme l'activité enzymatique est augmentée au niveau des cybrides mutants par rapport aux cellules contrôles. L'augmentation de cette enzyme est retrouvée dans de nombreux cancers (Friday et al., 2011; Jin et al., 2015). De manière intéressante la même quantité d' α -cétoglutarate est retrouvée au niveau des mutants et des contrôles. Le traitement avec les corps cétoniques ne change pas l'activité de la GDH, par contre une sous-expression est observée chez les mutants. Nous avons

également observé une augmentation d' α -cétoglutarate chez les contrôles, et une diminution chez les mutants après traitement avec les corps cétoniques. Cela conduit à l'hypothèse que cette diminution de l' α -cétoglutarate chez les mutants après traitement aux corps cétoniques proviendrait de son utilisation accrue par le CK et que cela entraînerait la réduction de la concentration de glutamate.

L'analyse de la seconde voie du catabolisme du glutamate via le GABA shunt a révélé une augmentation de l'expression de GAD1 mais aussi une abolition de l'expression d'ABAT pour les cybrides mutants. Le traitement aux corps cétoniques ne restaure pas cette voie, puisqu'aucune expression d'ABAT n'est visible après traitement de 48h chez les mutants. La diminution du glutamate observée après traitement aux corps cétoniques ne passe donc pas par la voie GABA shunt. Néanmoins après traitement nous avons observé une diminution de la concentration intracellulaire de GABA aussi bien chez les contrôles que chez les mutants.

Pour conclure, l'analyse de ces deux voies de catabolisme du glutamate nous a permis de mettre en évidence la dysfonction majeure du glutamate pour les cybrides MELAS. Le changement d'expression de Glud1 ainsi que la diminution d' α -cétoglutarate après exposition des cybrides mutants suggèrent fortement que la voie glutamate/ α -cétoglutarate est impliquée dans la réduction de la toxicité du métabolite.

b) **Confirmation du rôle du glutamate à partir de tissus autopsiques de cerveau d'un patient MELAS**

Tout d'abord, une étude par spectrométrie de masse nous a permis de mettre en évidence une augmentation de la concentration de glutamate et une diminution de GABA dans les tissus autopsiques de cerveau d'un patient MELAS par rapport aux cerveaux témoins. Ces résultats concordent avec les modèles cybrides *in vitro*.

Ensuite, nous avons regardé l'expression des enzymes du catabolisme du glutamate pour différentes régions cérébrales entre ce patient MELAS et des cerveaux témoins. D'une manière générale nous avons pu mettre en évidence une diminution de l'expression de toutes les enzymes GAD1, GDH et ABAT de manière plus ou moins marquée selon la région considérée. Cela démontre donc une dysfonction du catabolisme du glutamate dans le syndrome MELAS avec l'accumulation de celui-ci au niveau cérébral.

Comme mentionné dans la partie introduction 2.3.2.d une dérégulation de la GDH entraîne de nombreuses pathologies. Des dérégulations des isoformes de GAD65 et GAD67 entraînent également des désordres neurologiques et neuropsychiatriques tels que l'épilepsie, la dépression et la schizophrénie (Guidotti et al., 2000; Karolewicz et al., 2010; Qi et al., 2018). En effet les GADs sont les seules enzymes identifiées responsables de la production de GABA, c'est pourquoi un double KO GAD65/GAD67 révèle des niveaux presque indétectables de GABA chez les souris dans la période embryonnaire (Ji et al., 1999). Des KO de GAD67 chez des souris entraînent une mort néonatale, en lien avec des taux très bas de GABA (Asada et al., 1997). A l'inverse les souris KO pour GAD65 survivent après la naissance, aucune anomalie du développement n'est retrouvée et le niveau basal de GABA est normal, cependant ces souris présentent une vulnérabilité aux crises épileptiques (Asada et al., 1996; Kash et al., 1997). Fait très intéressant l'équipe de *Hwang et al* a montré un

lien direct entre le glutamate et l'expression de GAD1, montrant ainsi que l'excitotoxicité médiée par le glutamate peut intervenir directement sur la diminution de l'expression de GAD1. En effet ils ont montré dans des conditions d'hypoxie et par l'utilisation d'un antagoniste (MK801) des NMDA, que le niveau de GAD67 est restauré en normoxie. Ce résultat n'a pas été retrouvé pour GAD65, preuve ici que ces deux enzymes sont régulées différemment et que le glutamate n'impacte que GAD67 (Hwang et al., 2018).

En combinant ces différents résultats avec notre analyse des données obtenues sur les tissus cérébraux du patient MELAS, on peut mettre en avant un lien entre les concentrations importantes de glutamate, les concentrations réduites de GABA et la diminution de l'expression de GAD67. Ces données seront bien entendu à confirmer sur d'autres cerveaux de patients afin de vérifier que ce profil est bien retrouvé. Sur le plan thérapeutique, l'étude de molécules impliquées dans la voie du glutamate/GABA sur le syndrome MELAS pourrait permettre d'améliorer la symptomatologie pour les patients. Parmi ces molécules nous pouvons déjà citer la vitamine B6 ou la pyridoxine. Comme précédemment mentionné, la PLP fixe le domaine catalytique de GAD et permet donc l'activation de celle-ci. En effet lors des principaux événements catalytiques, l'holoenzyme (GAD lié au PLP) permet la conversion du glutamate en GABA et est régénérée dans le processus ; c'est-à-dire que GAD reste sous forme d'holoenzyme active lié au PLP. Cependant dans un plus faible pourcentage le glutamate peut être décarboxylé puis la GAD sous forme d'holoenzyme peut catalyser une transamination alternative produisant du semialdéhyde succinique et de la pyridoxamine-P (PMP) qui se dissocie donc de GAD (formation de l'apoenzyme inactif). GAD peut refixer de la PLP libre pour reformer une holoenzyme active, mais en absence de PLP, GAD reste inactivée (Battaglioli et al., 2003).

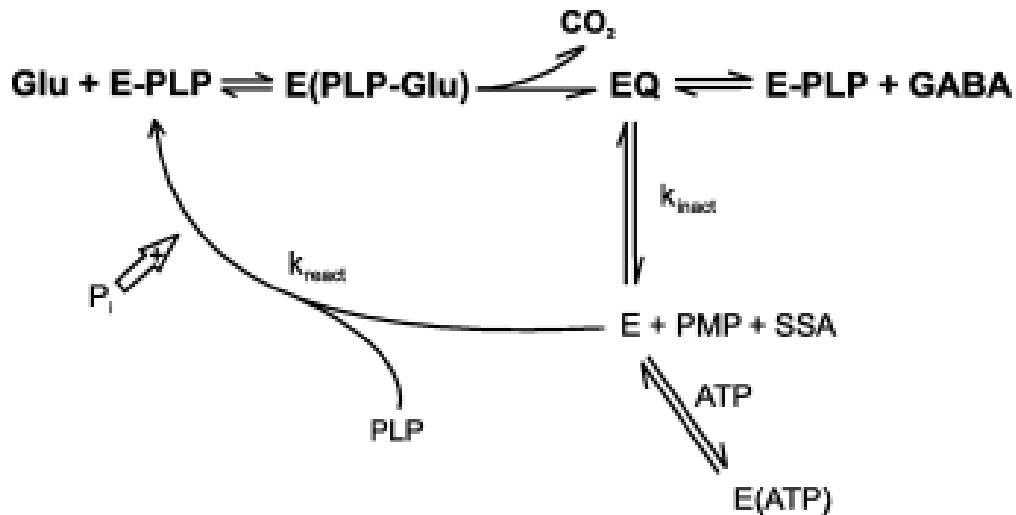


FIGURE 26 : Cycle d'activation et de désactivation de GAD

Dans la réaction principale en gras, l'holoGAD est active grâce à la liaison au PLP produit du GABA via la décarboxylation du glutamate. Dans une réaction secondaire suite à la décarboxylation du glutamate par l'holoGAD une réaction de transamination alternative produit un semialdéhyde succinique et l'apoGAD (formation de pyridoxamine-phosphate). E, apoGAD; E - PLP, holoGAD; EQ, quinoïde intermédiaire; P_i , phosphate inorganique; PLP, pyridoxal-phosphate; PMP, pyridoxamine-phosphate; SSA, semialdéhyde succinique. D'après (Battaglioli et al., 2003)

Un régime carencé en vitamine B6 provoque une augmentation de l'ARNm et de l'expression de l'ApoGAD chez des nouveaux nés de souris (Almeida et al., 2016). Dans une autre étude l'activité de GAD était fortement réduite alors que la présence de l'ApoGAD était également augmentée chez des rats issus de mères carencées en vitamine B6 (Bayoumi and Smith, 1972). L'augmentation de la forme ApoGAD dans cette étude proviendrait d'un phénomène de compensation. En effet, en l'absence de la PLP il y aurait en réponse une surproduction de GAD pour contrebalancer le phénomène. Nous avons retrouvé un niveau d'expression de GAD67 très important au niveau des cybrides MELAS, mais nous ne connaissons pas les niveaux de PLP présent dans ces cellules. L'augmentation de GAD proviendrait peut-être de ce phénomène de compensation lié à une diminution de l'holoGAD dans les cybrides MELAS. Si tel est le cas, les niveaux de PLP étant bas, la cellule compenserait par une augmentation de l'expression de GAD (visible dans nos expériences), mais la forme active HoloGAD n'étant pas possible, le glutamate ne pourrait donc pas être décarboxylé par celle-ci et donc moins de GABA serait produit (également visible dans nos expériences).

Une étude a montré les effets protecteurs de la pyridoxine ou vitamine B6 sur la neurotoxicité induite par le glutamate sur des cellules cérébelleuses de rat, posant l'hypothèse de son utilisation thérapeutique dans des lésions cérébrales hypoxiques (Büyükkokuroglu et al., 2007). Dans une autre étude, l'administration de vitamine B6 diminue les troubles épileptiques induis par l'utilisation d'acide kainique pour un modèle murin (analogue du glutamate). De plus dans des cellules de l'hippocampe, les concentrations de glutamates intracellulaires ont été diminuées après administration de vitamine B6, cette dernière résulterait d'une augmentation de l'activité de GAD (Dakshinamurti et al., 2003). L'administration de vitamine B6 pour des cellules murines a également montré une régulation positive sur le système GABAergique. En effet il a été reporté une augmentation de l'expression protéique de GAD67 et de la pyridoxal 5'-phosphate (PNP) qui est une enzyme nécessaire à la synthèse de la PLP (Yoo et al., 2011).

L'ensemble de ces études en lien avec la vitamine B6 regroupant, les effets antiépileptiques, la diminution des concentrations de glutamate et l'augmentation de l'expression de GAD en lien avec une augmentation de concentration de GABA, suggère son potentiel rôle bénéfique dans la pathologie MELAS.

Une autre molécule est connue pour améliorer les altérations de GAD67, la cystéamine qui est le dérivé décarboxylé de l'acide aminé cystéine. Chez des souris HRM schizophréniques l'expression de GAD67 est diminuée et l'administration de cystéamine améliore considérablement son expression (Kutiyanawalla et al., 2012).

Concernant ABAT ou GABA transaminase, cette enzyme dépendante de la PLP, permet la conversion de GABA en succinique semialdéhyde. Actuellement il existe très peu de mutations génétiques à l'origine de déficits en ABAT, seul quelques cas ont été décrits avec comme caractéristiques principales des retards psychomoteurs, des encéphalopathies, des hypotonies et des épilepsies réfractaires infantiles (Besse et al., 2015, 2016; Jaeken et al., 1984; Koenig et al., 2017; Tsuji et al., 2010). De manière intéressante, l'équipe de Besse *et al* a découvert une seconde fonction à cette enzyme, la diminution de ABAT aurait un lien avec la maintenance du génome mitochondrial. Ils ont démontré que des altérations de ABAT seraient responsables de déplétion au niveau de l'ADNmt (Besse et al., 2015).

3.3.5. Mise en évidence d'une dysfonction du cycle de Krebs améliorée après exposition aux corps cétoniques dans les cybrides MELAS.

Sur le plan métabolique, nous avons retrouvé une diminution du pyruvate et un excès de lactate au niveau des cybrides MELAS par rapport aux cybrides contrôles, témoignant d'un métabolisme glycolytique prédominant. Dans un second temps nous avons analysé les métabolites présents au niveau du CK. De manière intéressante nous avons pu mettre en évidence une accumulation de citrate, de fumarate et de malate ainsi qu'une diminution de succinate dans les cybrides MELAS. Ces résultats suggèrent que l'oxydation du succinate en lien avec l'activité du complexe II de la chaîne respiratoire mitochondriale est possible, mais que l'oxydation des substrats liés au NADH et donc à l'activité du complexe I est réduite pour les cybrides MELAS.

Le traitement avec des corps cétoniques entraîne une diminution du pyruvate dans les cellules MELAS et contrôles et une diminution de lactate également, objectivant un changement du métabolisme glycolytique vers un métabolisme oxydatif pour les cellules MELAS. Nous avons également retrouvé une diminution du citrate, du fumarate et du malate et une augmentation du succinate dans les cybrides MELAS. Ces changements d'intermédiaires du CK après traitement aux corps cétoniques chez les mutants témoignent d'une restauration du CK. La relance du CK permettrait donc l'utilisation du glutamate comme substrat énergétique majeur pour les cellules mutantes MELAS.

Discussion générale

Mon projet visait à mieux **comprendre la physiopathologie du syndrome MELAS**. Notamment le **défaut d'assemblage et d'activité du complexe I** de la chaîne mitochondriale entraînant un défaut oxydatif des cellules porteuses de la mutation m.3243A>G. Il portait également sur l'étude des stratégies métaboliques comme la diète cétogène et la restriction glucidique comme traitement potentiel de ce syndrome.

Cela nous a permis de **développer des stratégies diagnostiques et thérapeutiques** visant à améliorer le tableau clinique de la pathologie. Nous avons également pu montrer l'intérêt **des outils multi-omiques** dans **la compréhension de la physiopathologie** du MELAS et **dans l'identification de cibles potentielles**.

1. Apport de nos études sur la physiopathologie du MELAS

1.1.1. Défaut d'assemblage et d'activité du complexe I entraînant un défaut oxydatif de la cellule et impact sur les processus de biogénèse et mitophagie via l'utilisation de stratégies métaboliques

Notre travail a permis une meilleure compréhension de la physiopathologie du syndrome MELAS. En effet l'ensemble de nos résultats a permis de conclure que le déficit principal de celui-ci est lié à un défaut majeur de l'activité et de l'assemblage du complexe I. Ce défaut provoque un déficit oxydatif de la cellule, qui va donc devoir le compenser par une utilisation prédominante de la voie glycolytique. Nous avons également mis en évidence une perturbation du cycle du TCA et une augmentation de certains acides aminés dont en particulier le glutamate. L'ensemble de ces facteurs métaboliques pouvant contribuer à l'apparition et à la gravité de la symptomatologie du syndrome MELAS. Les stratégies métaboliques utilisées dans cette étude, que se soit par la restriction glucidique ou par l'apport de corps cétoniques, nous ont permis de renforcer nos connaissances dans la physiopathologie. D'autant plus que ces stratégies améliorent significativement les déficits rencontrés dans ce syndrome. En effet l'utilisation de la restriction glucidique, composante du régime cétogène a permis d'augmenter la quantité d'holoenzyme du complexe I tout en réduisant les intermédiaires d'assemblage. En parallèle, une augmentation de la quantité d'ADNmt et des différentes sous-unités de la chaîne OXPHOS ont également été retrouvés après 3 semaines sous restriction glucidique. L'ensemble de ces résultats suggère que les effets bénéfiques de la restriction glucidique serait dû à deux mécanismes majeurs, la biogénèse mitochondriale d'une part et la mitophagie d'autre part. Ce résultat confirme qu'une meilleure compréhension de la physiopathologie du MELAS est un atout majeur pour le développement de thérapeutiques et l'identification de cibles efficaces.

Nous pouvons d'ailleurs citer l'étude de *Carelli et al* qui propose que l'augmentation du nombre de copies d'ADNmt pour des individus asymptomatiques porteurs de mutations responsables de la maladie de Leber serait le reflet d'une biogénèse mitochondriale compensatoire, témoignant de la pénétrance incomplète de cette maladie et pouvant être utilisé comme stratégie thérapeutique (Giordano et al., 2014).

De nombreux agents stimulant la biogénèse sont d'ailleurs utilisés pour essayer d'améliorer le phénotype des pathologies, nous pouvons citer le 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucléotide (AICAR), le bézafibrate, le resvératrol ou encore l'acide rétinolique (Chae et al., 2013; Garrido-Maraver et al., 2015; Mizuguchi et al., 2017; Noe et al., 2013).

1.1.2. Intérêt des outils multi-omiques dans la découverte de nouveaux acteurs dans la physiopathologie du MELAS

Dans notre étude l'utilisation des outils omiques nous a permis de mettre en évidence des signatures différentes entre les cellules contrôles et MELAS. Nous avons choisi de nous pencher majoritairement sur le glutamate dans cette étude, mais d'autres métabolites comme la L-DOPA, l'aspartate ainsi que différentes voies de signalisations peuvent faire l'objet de nombreuses recherches supplémentaires dans notre étude. Il serait très intéressant de constituer une cohorte de patients présentant différents taux d'hétéroplasmies et de réaliser une signature métabolomique et transcriptomique de plasma et d'urine. En effet cela nous permettra peut-être de trouver des nouveaux marqueurs diagnostiques. De plus la mise en évidence de certains marqueurs pourrait apporter des éléments pronostics, soit de l'efficacité soit pour le suivi des thérapeutiques comme par exemple le régime cétoène.

2. Apports diagnostiques et thérapeutiques pour le syndrome MELAS

A ce jour une augmentation de lactate dans le plasma ou LCR des patients constitue un des éléments clés dans l'établissement du diagnostic du syndrome MELAS. L'identification de nouveaux biomarqueurs physiopathologiques reste néanmoins très importante car elle permet de mieux appréhender et comprendre les mécanismes essentiels dans la physiologie d'une maladie mais elle permet également d'identifier des cibles potentielles pour un traitement. Nous pouvons prendre l'exemple de l'excès de glutamate retrouvé dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA). En effet dans les années 80 des taux anormaux de glutamate sont retrouvés dans le plasma et LCR de patients SLA (Patten et al., 1978; Plaitakis and Caroscio, 1987). Ces données ont permis de mettre en évidence des nouvelles cibles dans la physiopathologie de la SLA. En effet de nombreuses études ont mis en évidence l'altération de l'expression du transporteur d'acides aminés excitateurs de type II (EAAT2) dans cette pathologie (Bristol and Rothstein, 1996; Rothstein et al., 1992).

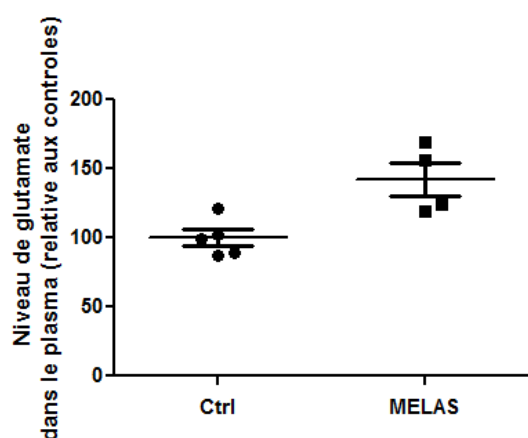
Ces nouvelles cibles permettent d'imaginer des nouvelles stratégies thérapeutiques et ainsi de lancer des essais cliniques avec par exemple le riluzole, une molécule possédant des propriétés anti-glutaminergiques. Ce traitement s'est révélé efficace avec une augmentation du taux de survie des patients souffrant d'une SLA (Bensimon et al., 1994).

2.1. Le glutamate marqueur potentiel du syndrome MELAS ?

Nous avons montré dans notre étude qu'une augmentation significative de glutamate est retrouvée dans les modèles cellulaires cybrides MELAS ainsi que dans les tissus autopsiques d'un patient MELAS (article 3). De plus cette augmentation de glutamate intracellulaire est parfaitement corrélée au degré d'hétéroplasmie mitochondriale. Ce point est particulièrement important, car le taux de glutamate pourrait représenter un marqueur en fonction du degré d'hétéroplasmie et de la gravité de la pathologie. Nous avons également mis en évidence une perturbation de l'expression des enzymes dans les voies du glutamate (GDH, GAD et ABAT) chez les cybrides SH-SY5Y et les tissus du patient MELAS. Enfin l'utilisation du régime cétogène a permis de réduire significativement le taux de glutamate dans les cybrides MELAS. L'ensemble de ces résultats suggèrent que le glutamate pourrait être un bon biomarqueur pour le diagnostic et le suivi des patients MELAS. De plus sa dérégulation dans la physiopathologie du MELAS ouvre de nouvelles perspectives dans la recherche de cibles potentielles.

2.1.1. Analyse du glutamate à partir de plasmas de patients MELAS

Lors d'une étude préliminaire récente, nous avons dosé le glutamate dans le plasma de 5 individus contrôles et 4 patients MELAS. Les résultats sont présentés ci-dessous avec une augmentation significative ($p=0.0317$) du glutamate retrouvé dans le groupe MELAS (figure 27). De plus il semble que la concentration de glutamate dans le plasma suive le taux d'hétéroplasmie, en effet pour au moins 3 patients de l'étude ce niveau apparait corrélé avec la charge mutationnelle.



hétéroplasmie	taux glutamate/ctrl
100	169.5
94	124
92	157
89	120

FIGURE 27 : Analyse du niveau de glutamate dans le plasma de patients MELAS et de contrôles (ctrl).

2.1.2. Conclusion et perspectives

Les résultats de cette étude préliminaire confirment les résultats retrouvés dans notre étude sur les cybrides et les tissus de patient MELAS avec des variations de la concentration du glutamate en lien avec le degré d'hétéroplasmie. Il serait donc intéressant dans un premier temps d'augmenter la cohorte à la fois de contrôles et de patients afin de confirmer cette augmentation du glutamate dans le plasma des patients MELAS. Dans un second temps il serait très intéressant de séparer la cohorte de patients MELAS en différents groupes suivant le taux d'hétéroplasmie.

L'utilisation de corps cétoniques dans notre étude a permis de réduire la toxicité du glutamate dans les cybrides MELAS quels que soient leur taux d'hétéroplasmie. Il serait donc intéressant dans un premier temps de regarder la signature transcriptomique et métabolomique des cybrides (70-90 et 98 % de mutation) avec traitement aux corps cétoniques versus sans traitement. Dans un second temps de regarder la signature métabolique dans les plasmas de patients MELAS en fonction de leur degré d'hétéroplasmie. En effet cela nous permettra de valider l'implication du glutamate et de ces voies dans la physiopathologie du MELAS et potentiellement de mettre en évidence d'autres cibles pouvant intervenir dans la pathologie.

2.2. Identification de cibles visant le glutamate et/ou les voies métaboliques impliquant le glutamate

L'utilisation des corps cétoniques sur nos cybrides MELAS diminue la concentration de glutamate avec une relance métabolique du TCA. En effet les différents métabolites du TCA varient énormément par rapport aux cybrides non traités. Nous avons alors émis l'hypothèse que cette relance du TCA est la conséquence du traitement par les corps cétoniques qui permettent l'utilisation du glutamate comme substrat énergétique après conversion en α -cétoglutarate. *Chen et al* ont montré l'intérêt de la supplémentation en glutamate et avec un analogue à l' α -cétoglutarate (DMK), pour des cellules déficientes OXPHOS sur milieu de culture réduit en glucose (Chen et al., 2018). L' α -cétoglutarate utilisé comme substrat énergétique permet d'augmenter la prolifération cellulaire, la respiration cellulaire et la teneur en ATP. Néanmoins ils montrent aussi que les effets bénéfiques du DMK et donc de l'anaplérose sont bénéfiques pour des lignées cellulaires porteuses de mutations d'ADNmt mais qui possède malgré tout une activité OXPHOS résiduelle (pas de différence sur une lignée homoplasmique 100% COX I 100% MUT) (Chen et al., 2018). De plus la supplémentation en α -cétoglutarate et en oxaloacétate chez des souris présentant une épilepsie induite par de l'acide kainique permettrait une réduction drastique des crises (Yamamoto and Mohanan, 2003). L'ensemble de ces données confirment l'importance de cette voie glutamate/ α -cétoglutarate dans les pathologies et notamment dans les pathologies mitochondriales. Il serait donc intéressant de tester les effets de la supplémentation en α -cétoglutarate sur nos cybrides MELAS.

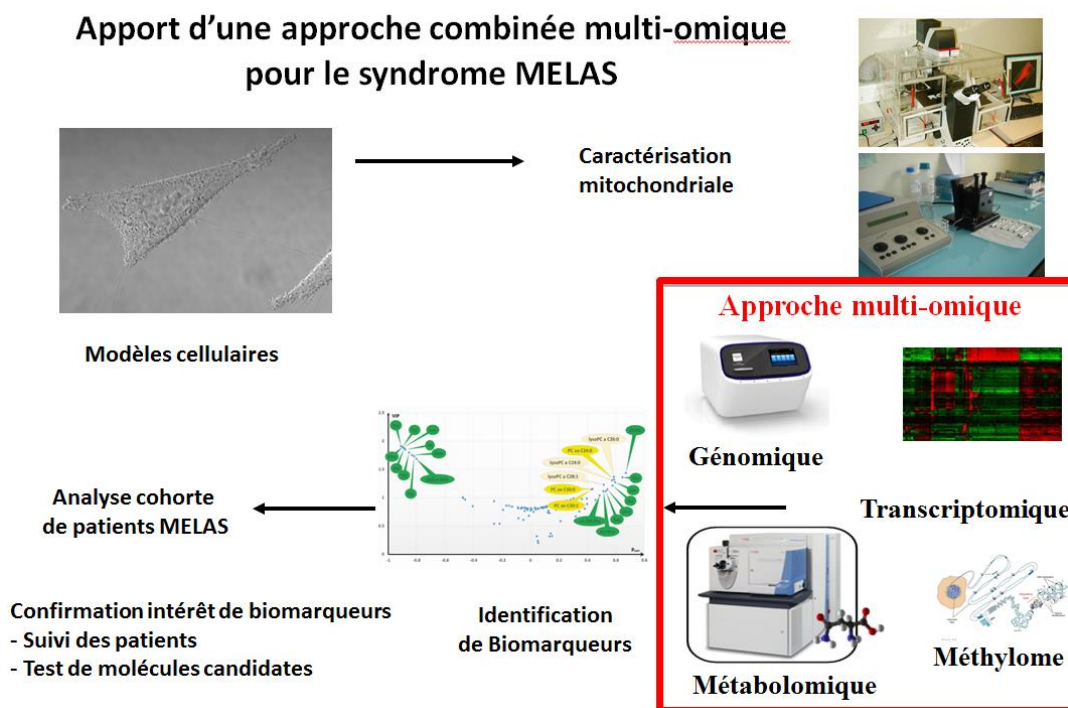
Toujours en lien avec cette voie glutamate/ α -cétoglutarate nous avons vu que l'expression de l'enzyme de conversion GDH est altérée aussi bien dans les cybrides que dans les tissus du patient MELAS. Comme précédemment mentionné, SIRT 4 régule négativement l'activité de la GDH. Il serait donc dans un premier temps intéressant de regarder le niveau d'expression de SIRT4 dans nos cybrides MELAS. Dans un second temps, on pourrait suivre cette expression de SIRT4 en fonction du type de régime utilisé (restriction glucidique ou régime cétogène). En effet une étude montre qu'une alimentation hypocalorique régule négativement l'activité de SIRT4 permettant ainsi l'augmentation de la GDH dans les cellules β pancréatiques (Haigis et al., 2006). L'activité de SIRT4 est également retrouvée modifiée dans plusieurs pathologies (cancer, diabète, hyperinsulinémie, maladie cardiaque, neurodégénérescence...), ce qui en ferait un candidat potentiel pour une thérapie ciblée (Betsinger and Cristea, 2019). De plus il a été montré que SIRT4 jouerait un rôle neuroprotecteur dans le cerveau des souris. Chez des souris KO pour SIRT4, l'expression du transporteur du glutamate est diminuée (Shih et al., 2014). Il a également été montré que SIRT4 agissait directement sur la fonction mitochondriale. L'augmentation de son expression entraîne une réduction de la consommation d'O₂, une diminution du potentiel de membrane et une surproduction de ROS. Ceci conduisant à une accumulation de mitochondries non fonctionnelles (Lang and Rol, 2017).

Enfin, l'analyse de nos résultats multi-omiques nous a permis d'identifier le glutamate comme un point central de la physiopathologie du MELAS. Or plusieurs molécules déjà utilisées dans certaines pathologies, cible le glutamate ou des acteurs en lien avec celui-ci. Nous pouvons par exemple citer la mémantine qui est utilisée dans la maladie d'Alzheimer. En effet l'implication du glutamate dans la neurotoxicité entraînant la pathogenèse de cette maladie est aujourd'hui de plus en plus acceptée, et proviendrait notamment d'une suractivation des transporteurs NMDA (Danysz et al., 2000). Or la mémantine est un antagoniste des récepteurs NMDA (Bormann, 1989). De plus plusieurs études ont montrés l'implication de la mitochondrie dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer. En effet des altérations de certaines enzymes mitochondriales et notamment une diminution de l'activité du complexe I dans des cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer ou de souris reproduisant cette pathologie ont été observées (Chandrasekaran et al., 1996; Rhein et al., 2009). Une étude a d'ailleurs établi un lien entre la neuroprotection induite par la mémantine sur un modèle de toxicité rétinienne provoquée par la roténone (inhibiteur spécifique du complexe I). La conclusion de cette étude est que la mémantine pourrait notamment être une stratégie neuroprotectrice dans les pathologie mitochondriales à l'origine d'une activation des NMDA (Rojas et al., 2008). D'autres molécules comme la clozapine, la peroxiredoxine, la D-cycloserine, la lamotrigine, la ceftriaxone ou l'acide valproïque...(Javitt, 2004) sont utilisées dans des pathologies impliquant le glutamate. La mise en évidence du rôle du glutamate dans le syndrome MELAS ouvre des perspectives et des traitements potentiels pour cette pathologie.

Conclusion

Ce travail nous a permis à partir de cybrides SHSH-5Y porteurs de la mutation m.3243A>G à différent taux d'hétéroplasmies, d'établir une caractérisation mitochondriale précise. Nous avons pu mettre en évidence un déficit majeur du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale aussi bien au niveau de son activité que de son assemblage et de rendre compte d'un dysfonctionnement oxydatif de ces cellules avec utilisation préférentielle de la voie glycolytique. Nous avons également démontré un dysfonctionnement mitochondrial avec une diminution de la respiration de routine et de la respiration médié pour la synthèse d'ATP. A cela s'ajoute une atteinte morphologique des mitochondries pour des modèles cellulaires cybrides avec un fort taux de mutation dont le réseau mitochondrial apparait totalement fragmentée.

L'utilisation combinée de différentes stratégies omiques comme la transcriptomique et la métabolomique, nous a permis de mettre en évidence une signature métabolique spécifique corrélée à des clusters de gènes impactés différenciellement entre les cybrides contrôles et les cybrides porteurs de différents taux de la mutation m.3243A>G. Nous avons pu mettre en évidence que le glutamate et les voies de signalisations qui y sont associées sont des élément clés pour comprendre la pathogénicité du syndrome MELAS. De plus, cet approche multi-omique nous a permis d'identifier des biomarqueurs potentiels de ce syndrome. Une confirmation de ces biomarqueurs reste cependant à réaliser sur une plus grande cohorte de patient MELAS et sur une plus grande diversité de tissus (sang/plasma/urine/biopsie). La validation de ces nouveaux biomarqueurs constituerait une aide précieuse pour le diagnostic surtout s'ils sont le reflet du degré d'hétéroplasmie et/ou de la sévérité de la maladie. Ils pourraient permettre améliorer le suivi des patients dans le temps ou lors d'un traitement thérapeutique (essai clinique). Nous confirmons par ce travail que l'utilisation combinée de techniques multi-omiques s'avère d'une aide précieuse dans la compréhension fine des physiopathologies et dans l'identification de bio-marqueurs.



Bibliographie

Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U.E., Thiselton, D.L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G., et al. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat. Genet.* 26, 211–215.

Almeida, M.R., Mabasa, L., Crane, C., Park, C.S., Venâncio, V.P., Bianchi, M.L.P., and Antunes, L.M.G. (2016). Maternal vitamin B6 deficient or supplemented diets on expression of genes related to GABAergic, serotonergic, or glutamatergic pathways in hippocampus of rat dams and their offspring. *Mol. Nutr. Food Res.* 60, 1615–1624.

Alston, C.L., Davison, J.E., Meloni, F., van der Westhuizen, F.H., He, L., Hornig-Do, H.-T., Peet, A.C., Gissen, P., Goffrini, P., Ferrero, I., et al. (2012). Recessive germline SDHA and SDHB mutations causing leukodystrophy and isolated mitochondrial complex II deficiency. *J. Med. Genet.* 49, 569–577.

Altman, B.J., Stine, Z.E., and Dang, C.V. (2016). From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* 16, 619–634.

Amiel, S.A. (1995). Organ fuel selection: brain. *Proc. Nutr. Soc.* 54, 151–155.

Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R., Ji, F.Y., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., et al. (1996). Mice lacking the 65 kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229, 891–895.

Asada, H., Kawamura, Y., Maruyama, K., Kume, H., Ding, R.-G., Kanbara, N., Kuzume, H., Sanbo, M., Yagi, T., and Obata, K. (1997). Cleft palate and decreased brain γ -aminobutyric acid in mice lacking the 67-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 94, 6496–6499.

Bao, X., Pal, R., Hascup, K.N., Wang, Y., Wang, W.-T., Xu, W., Hui, D., Agbas, A., Wang, X., Michaelis, M.L., et al. (2009). Transgenic expression of Glud1 (glutamate dehydrogenase 1) in neurons: in vivo model of enhanced glutamate release, altered synaptic plasticity, and selective neuronal vulnerability. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29, 13929–13944.

Barborka, C.J. (1928). KETOGENIC DIET TREATMENT OF EPILEPSY IN ADULTS. *J. Am. Med. Assoc.* 91, 73–78.

Barel, O., Shorer, Z., Flusser, H., Ofir, R., Narkis, G., Finer, G., Shalev, H., Nasasra, A., Saada, A., and Birk, O.S. (2008). Mitochondrial complex III deficiency associated with a homozygous mutation in UQCRCQ. *Am. J. Hum. Genet.* 82, 1211–1216.

Battaglioli, G., Liu, H., and Martin, D.L. (2003). Kinetic differences between the isoforms of glutamate decarboxylase: implications for the regulation of GABA synthesis. *J. Neurochem.* 86, 879–887.

Baxter, R.V., Ben Othmane, K., Rochelle, J.M., Stajich, J.E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Ben Hamida, M., Bel, S., Stenger, J.E., et al. (2002). Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat. Genet.* 30, 21–22.

Bayoumi, R.A., and Smith, W.R.D. (1972). SOME EFFECTS OF DIETARY VITAMIN B6 DEFICIENCY ON γ -AMINOBTYRIC ACID METABOLISM IN DEVELOPING RAT BRAIN. *J. Neurochem.* 19, 1883–1897.

Bensimon, G., Lacomblez, L., and Meininger, V. (1994). A controlled trial of riluzole in amyotrophic lateral sclerosis. ALS/Riluzole Study Group. *N. Engl. J. Med.* 330, 585–591.

Bentlage, H.A., and Attardi, G. (1996). Relationship of genotype to phenotype in fibroblast-derived transmitochondrial cell lines carrying the 3243 mutation associated with the MELAS encephalomyopathy: shift towards mutant genotype and role of mtDNA copy number. *Hum. Mol. Genet.* 5, 197–205.

Beretta, S., Mattavelli, L., Sala, G., Tremolizzo, L., Schapira, A.H.V., Martinuzzi, A., Carelli, V., and Ferrarese, C. (2004). Leber hereditary optic neuropathy mtDNA mutations disrupt glutamate transport in cybrid cell lines. *Brain J. Neurol.* 127, 2183–2192.

- Besse, A., Wu, P., Bruni, F., Donti, T., Graham, B.H., Craigen, W.J., McFarland, R., Moretti, P., Lalani, S., Scott, K.L., et al. (2015). The GABA Transaminase, ABAT, Is Essential for Mitochondrial Nucleoside Metabolism. *Cell Metab.* *21*, 417–427.
- Besse, A., Petersen, A.K., Hunter, J.V., Appadurai, V., Lalani, S.R., and Bonnen, P.E. (2016). Personalized medicine approach confirms a milder case of ABAT deficiency. *Mol. Brain* *9*, 93.
- Betsinger, C.N., and Cristea, I.M. (2019). Mitochondrial Function, Metabolic Regulation, and Human Disease Viewed through the Prism of Sirtuin 4 (SIRT4) Functions. *J. Proteome Res.* *18*, 1929–1938.
- Bianco, A., Martínez-Romero, I., Bisceglia, L., D'Agruma, L., Favia, P., Ruiz-Pesini, E., Guerriero, S., Montoya, J., and Petruzzella, V. (2016). Mitochondrial DNA copy number differentiates the Leber's hereditary optic neuropathy affected individuals from the unaffected mutation carriers. *Brain J. Neurol.* *139*, e1.
- Birch-Machin, M.A., Taylor, R.W., Cochran, B., Ackrell, B.A., and Turnbull, D.M. (2000). Late-onset optic atrophy, ataxia, and myopathy associated with a mutation of a complex II gene. *Ann. Neurol.* *48*, 330–335.
- van der Blik, A.M., Shen, Q., and Kawajiri, S. (2013). Mechanisms of mitochondrial fission and fusion. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *5*.
- Bormann, J. (1989). Memantine is a potent blocker of N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor channels. *Eur. J. Pharmacol.* *166*, 591–592.
- Bough, K.J., Wetherington, J., Hassel, B., Pare, J.F., Gawryluk, J.W., Greene, J.G., Shaw, R., Smith, Y., Geiger, J.D., and Dingledine, R.J. (2006). Mitochondrial biogenesis in the anticonvulsant mechanism of the ketogenic diet. *Ann. Neurol.* *60*, 223–235.
- Bourgeron, T., Rustin, P., Chretien, D., Birch-Machin, M., Bourgeois, M., Viegas-Péquignot, E., Munnich, A., and Rötig, A. (1995). Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat. Genet.* *11*, 144–149.
- Bris, C., Desquirit-Dumas, V., Gueguen, N., Amati-Bonneau, P., Reynier, P., and Procaccio, V. (2018). Pathologies liées à des mutations de l'ADN mitochondrial. *Rev. Francoph. Lab.* *2018*, 71–80.
- Bristol, L.A., and Rothstein, J.D. (1996). Glutamate transporter gene expression in amyotrophic lateral sclerosis motor cortex. *Ann. Neurol.* *39*, 676–679.
- Büyükkuroglu, M.E., Gepdiremen, A., Taştekin, A., and Ors, R. (2007). Pyridoxine may protect the cerebellar granular cells against glutamate-induced toxicity. *Int. J. Vitam. Nutr. Res. Int. Z. Vitam.- Ernährungsforschung J. Int. Vitaminol. Nutr.* *77*, 336–340.
- Buzkova, J., Nikkanen, J., Ahola, S., Hakonen, A.H., Sevastianova, K., Hovinen, T., Yki-Järvinen, H., Pietiläinen, K.H., Lönnqvist, T., Velagapudi, V., et al. (2018). Metabolomes of mitochondrial diseases and inclusion body myositis patients: treatment targets and biomarkers. *EMBO Mol. Med.* *10*.
- Calvo, S.E., Clauser, K.R., and Mootha, V.K. (2016). MitoCarta2.0: an updated inventory of mammalian mitochondrial proteins. *Nucleic Acids Res.* *44*, D1251–D1257.
- Caporali, L., Maresca, A., Capristo, M., Del Dotto, V., Tagliavini, F., Valentino, M.L., La Morgia, C., and Carelli, V. (2017). Incomplete penetrance in mitochondrial optic neuropathies. *Mitochondrion* *36*, 130–137.
- Carroll, J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Shannon, R.J., Hirst, J., and Walker, J.E. (2006). Bovine Complex I Is a Complex of 45 Different Subunits. *J. Biol. Chem.* *281*, 32724–32727.
- Chae, S., Ahn, B.Y., Byun, K., Cho, Y.M., Yu, M.-H., Lee, B., Hwang, D., and Park, K.S. (2013). A Systems Approach for Decoding Mitochondrial Retrograde Signaling Pathways. *Sci. Signal.* *6*, rs4–rs4.

- Chan, S.W., Dunlop, R.A., Rowe, A., Double, K.L., and Rodgers, K.J. (2012). L-DOPA is incorporated into brain proteins of patients treated for Parkinson's disease, inducing toxicity in human neuroblastoma cells in vitro. *Exp. Neurol.* *238*, 29–37.
- Chandrasekaran, K., Hatanpää, K., Brady, D.R., and Rapoport, S.I. (1996). Evidence for physiological down-regulation of brain oxidative phosphorylation in Alzheimer's disease. *Exp. Neurol.* *142*, 80–88.
- Chen, Q., Kirk, K., Shurubor, Y.I., Zhao, D., Arreguin, A.J., Shahi, I., Valsecchi, F., Primiano, G., Calder, E.L., Carelli, V., et al. (2018). Rewiring of Glutamine Metabolism Is a Bioenergetic Adaptation of Human Cells with Mitochondrial DNA Mutations. *Cell Metab.* *27*, 1007-1025.e5.
- Choi, D.W. (1985). Glutamate neurotoxicity in cortical cell culture is calcium dependent. *Neurosci. Lett.* *58*, 293–297.
- Choi, D.W. (1988). Glutamate neurotoxicity and diseases of the nervous system. *Neuron* *1*, 623–634.
- Chomyn, A., Martinuzzi, A., Yoneda, M., Daga, A., Hurko, O., Johns, D., Lai, S.T., Nonaka, I., Angelini, C., and Attardi, G. (1992). MELAS mutation in mtDNA binding site for transcription termination factor causes defects in protein synthesis and in respiration but no change in levels of upstream and downstream mature transcripts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *89*, 4221–4225.
- Chomyn, A., Enriquez, J.A., Micol, V., Fernandez-Silva, P., and Attardi, G. (2000). The mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episode syndrome-associated human mitochondrial tRNA^{Leu}(UUR) mutation causes aminoacylation deficiency and concomitant reduced association of mRNA with ribosomes. *J. Biol. Chem.* *275*, 19198–19209.
- Čížková, A., Stránecký, V., Mayr, J.A., Tesařová, M., Havlíčková, V., Paul, J., Ivánek, R., Kuss, A.W., Hansíková, H., Kaplanová, V., et al. (2008). TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy. *Nat. Genet.* *40*, 1288–1290.
- Clayton, D.A. (1982). Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* *28*, 693–705.
- Cohen, M.M.J., Leboucher, G.P., Livnat-Levanon, N., Glickman, M.H., and Weissman, A.M. (2008). Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion. *Mol. Biol. Cell* *19*, 2457–2464.
- Colon, A.D., Plaitakis, A., Perakis, A., Berl, S., and Clarke, D.D. (1986). Purification and characterization of a soluble and a particulate glutamate dehydrogenase from rat brain. *J. Neurochem.* *46*, 1811–1819.
- Coyle, J.T., Molliver, M.E., and Kuhar, M.J. (1978). In situ injection of kainic acid: A new method for selectively lesioning neuronal cell bodies while sparing axons of passage. *J. Comp. Neurol.* *180*, 301–323.
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., García-Planells, J., Chumillas, M.J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marín, I., Vílchez, J.J., and Palau, F. (2002). The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat. Genet.* *30*, 22–25.
- Curtis, D.R., Phillis, J.W., and Watkins, J.C. (1960). The chemical excitation of spinal neurones by certain acidic amino acids. *J. Physiol.* *150*, 656–682.
- Dahlin, M., Elfving, A., Ungerstedt, U., and Amark, P. (2005). The ketogenic diet influences the levels of excitatory and inhibitory amino acids in the CSF in children with refractory epilepsy. *Epilepsy Res.* *64*, 115–125.
- Daikhin, Y., and Yudkoff, M. (1998). Ketone bodies and brain glutamate and GABA metabolism. *Dev. Neurosci.* *20*, 358–364.
- Dakshinamurti, K., Sharma, S.K., and Geiger, J.D. (2003). Neuroprotective actions of pyridoxine. *Biochim. Biophys. Acta* *1647*, 225–229.

- Danysz, W., Parsons, C.G., Mobius, H.J., Stoffer, A., and Quack, G. (2000). Neuroprotective and symptomatological action of memantine relevant for Alzheimer's disease--a unified glutamatergic hypothesis on the mechanism of action. *Neurotox. Res.* 2, 85-97.
- Daum, G. (1985). Lipids of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* 822, 1-42.
- De Vivo, D.C., Trifiletti, R.R., Jacobson, R.I., Ronen, G.M., Behmand, R.A., and Harik, S.I. (1991). Defective Glucose Transport across the Blood-Brain Barrier as a Cause of Persistent Hypoglycorrhachia, Seizures, and Developmental Delay. *N. Engl. J. Med.* 325, 703-709.
- Denner, L.A., and Wu, J.Y. (1985). Two forms of rat brain glutamic acid decarboxylase differ in their dependence on free pyridoxal phosphate. *J. Neurochem.* 44, 957-965.
- Desquirit-Dumas, V., Gueguen, N., Barth, M., Chevrollier, A., Hancock, S., Wallace, D.C., Amati-Bonneau, P., Henrion, D., Bonneau, D., Reynier, P., et al. (2012). Metabolically induced heteroplasmy shifting and l-arginine treatment reduce the energetic defect in a neuronal-like model of MELAS. *Biochim. Biophys. Acta* 1822, 1019-1029.
- DeVivo, D.C., Leckie, M.P., Ferrendelli, J.S., and McDougal, D.B. (1978). Chronic ketosis and cerebral metabolism. *Ann. Neurol.* 3, 331-337.
- DiFrancesco, J.C., Cooper, J.M., Lam, A., Hart, P.E., Tremolizzo, L., Ferrarese, C., and Schapira, A.H. (2008). MELAS mitochondrial DNA mutation A3243G reduces glutamate transport in cybrids cell lines. *Exp. Neurol.* 212, 152-156.
- DiMauro, S. (2004). Mitochondrial diseases. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 80-88.
- Dunbar, D.R., Moonie, P.A., Zeviani, M., and Holt, I.J. (1996). Complex I deficiency is associated with 3243G:C mitochondrial DNA in osteosarcoma cell cybrids. *Hum. Mol. Genet.* 5, 123-129.
- During, M.J., and Spencer, D.D. (1993). Extracellular hippocampal glutamate and spontaneous seizure in the conscious human brain. *Lancet Lond. Engl.* 341, 1607-1610.
- Eales, K.L., Hollinshead, K.E.R., and Tennant, D.A. (2016). Hypoxia and metabolic adaptation of cancer cells. *Oncogenesis* 5, e190.
- El Sabbagh, S., Lebre, A.-S., Bahi-Buisson, N., Delonlay, P., Soufflet, C., Boddaert, N., Rio, M., Rötig, A., Dulac, O., Munnich, A., et al. (2010). Epileptic phenotypes in children with respiratory chain disorders. *Epilepsia* 51, 1225-1235.
- El-Hattab, A.W., Hsu, J.W., Emrick, L.T., Wong, L.-J.C., Craigen, W.J., Jahoor, F., and Scaglia, F. (2012a). Restoration of impaired nitric oxide production in MELAS syndrome with citrulline and arginine supplementation. *Mol. Genet. Metab.* 105, 607-614.
- El-Hattab, A.W., Emrick, L.T., Craigen, W.J., and Scaglia, F. (2012b). Citrulline and arginine utility in treating nitric oxide deficiency in mitochondrial disorders. *Mol. Genet. Metab.* 107, 247-252.
- El-Hattab, A.W., Adesina, A.M., Jones, J., and Scaglia, F. (2015). MELAS syndrome: Clinical manifestations, pathogenesis, and treatment options. *Mol. Genet. Metab.* 116, 4-12.
- El-Hattab, A.W., Emrick, L.T., Hsu, J.W., Chanprasert, S., Almannai, M., Craigen, W.J., Jahoor, F., and Scaglia, F. (2016). Impaired nitric oxide production in children with MELAS syndrome and the effect of arginine and citrulline supplementation. *Mol. Genet. Metab.* 117, 407-412.
- Engel, P.C. (2014). Glutamate dehydrogenases: the why and how of coenzyme specificity. *Neurochem. Res.* 39, 426-432.
- Ercińska, M., and Silver, I.A. (1990). Metabolism and role of glutamate in mammalian brain. *Prog. Neurobiol.* 35, 245-296.

- Erecińska, M., Nelson, D., Daikhin, Y., and Yudkoff, M. (1996). Regulation of GABA level in rat brain synaptosomes: fluxes through enzymes of the GABA shunt and effects of glutamate, calcium, and ketone bodies. *J. Neurochem.* *67*, 2325–2334.
- Erlander, M.G., Tillakaratne, N.J., Feldblum, S., Patel, N., and Tobin, A.J. (1991). Two genes encode distinct glutamate decarboxylases. *Neuron* *7*, 91–100.
- Esterhuizen, K., Lindeque, J.Z., Mason, S., van der Westhuizen, F.H., Suomalainen, A., Hakonen, A.H., Carroll, C.J., Rodenburg, R.J., de Laat, P.B., Janssen, M.C.H., et al. (2019). A urinary biosignature for mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke like episodes (MELAS). *Mitochondrion* *45*, 38–45.
- Falk, R.E., Cederbaum, S.D., Blass, J.P., Gibson, G.E., Kark, R.A.P., and Carrel, R.E. (1976). Ketonic Diet in the Management of Pyruvate Dehydrogenase Deficiency. *Pediatrics* *58*, 713–721.
- Ferrante, R.J., Andreassen, O.A., Jenkins, B.G., Dedeoglu, A., Kuemmerle, S., Kubilus, J.K., Kaddurah-Daouk, R., Hersch, S.M., and Beal, M.F. (2000). Neuroprotective Effects of Creatine in a Transgenic Mouse Model of Huntington's Disease. *J. Neurosci.* *20*, 4389–4397.
- Finsterer, J. (2009). Manifestations of the mitochondrial A3243G mutation. *Int. J. Cardiol.* *137*, 60–62.
- Fonnum, F. (1984). Glutamate: a neurotransmitter in mammalian brain. *J. Neurochem.* *42*, 1–11.
- Frazier, A.E., Thorburn, D.R., and Compton, A.G. (2019). Mitochondrial energy generation disorders: genes, mechanisms, and clues to pathology. *J. Biol. Chem.* *294*, 5386–5395.
- Frey, S., Geffroy, G., Desquirit-Dumas, V., Gueguen, N., Bris, C., Belal, S., Amati-Bonneau, P., Chevrollier, A., Barth, M., Henrion, D., et al. (2017). The addition of ketone bodies alleviates mitochondrial dysfunction by restoring complex I assembly in a MELAS cellular model. *Biochim. Biophys. Acta* *1863*, 284–291.
- Friday, E., Oliver, R., Welbourne, T., and Turturro, F. (2011). Glutaminolysis and glycolysis regulation by troglitazone in breast cancer cells: Relationship to mitochondrial membrane potential. *J. Cell. Physiol.* *226*, 511–519.
- Frigerio, F., Karaca, M., De Roo, M., Mlynárik, V., Skytt, D.M., Carobbio, S., Pajęcka, K., Waagepetersen, H.S., Gruetter, R., Muller, D., et al. (2012). Deletion of glutamate dehydrogenase 1 (Glud1) in the central nervous system affects glutamate handling without altering synaptic transmission. *J. Neurochem.* *123*, 342–348.
- Furuta, A., Noda, M., Suzuki, S.O., Goto, Y., Kanahori, Y., Rothstein, J.D., and Iwaki, T. (2003). Translocation of glutamate transporter subtype excitatory amino acid carrier 1 protein in kainic acid-induced rat epilepsy. *Am. J. Pathol.* *163*, 779–787.
- Garcia-Roves, P., Huss, J.M., Han, D.-H., Hancock, C.R., Iglesias-Gutierrez, E., Chen, M., and Holloszy, J.O. (2007). Raising plasma fatty acid concentration induces increased biogenesis of mitochondria in skeletal muscle. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 10709–10713.
- Garone, C., Minczuk, M., Stenton, S.L., and Prokisch, H. (2018). Advancing genomic approaches to the molecular diagnosis of mitochondrial disease. *Essays Biochem.* *62*, 399–408.
- Garrido-Maraver, J., Paz, M.V., Cordero, M.D., Bautista-Lorite, J., Oropesa-Ávila, M., de la Mata, M., Pavón, A.D., de Laveria, I., Alcocer-Gómez, E., Galán, F., et al. (2015). Critical role of AMP-activated protein kinase in the balance between mitophagy and mitochondrial biogenesis in MELAS disease. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.* *1852*, 2535–2553.
- van Gelder, N.M., Janjua, N.A., Metrakos, K., MacGibbon, B., and Metrakos, J.D. (1980). Plasma amino acids in 3/sec spike-wave epilepsy. *Neurochem. Res.* *5*, 659–671.
- Ghezzi, D., Goffrini, P., Uziel, G., Horvath, R., Klopstock, T., Lochmüller, H., D'Adamo, P., Gasparini, P., Strom, T.M., Prokisch, H., et al. (2009). SDHAF1, encoding a LYR complex-II specific assembly factor, is mutated in SDH-defective infantile leukoencephalopathy. *Nat. Genet.* *41*, 654–656.

- Giannopoulos, S., Samardzic, K., Raymond, B.B.A., Djordjevic, S.P., and Rodgers, K.J. (2019). L-DOPA causes mitochondrial dysfunction in vitro: A novel mechanism of L-DOPA toxicity uncovered. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *117*, 105624.
- Giordano, C., Iommarini, L., Giordano, L., Maresca, A., Pisano, A., Valentino, M.L., Caporali, L., Liguori, R., Deceglie, S., Roberti, M., et al. (2014). Efficient mitochondrial biogenesis drives incomplete penetrance in Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain J. Neurol.* *137*, 335–353.
- Gjedde, A., and Crone, C. (1975). Induction processes in blood-brain transfer of ketone bodies during starvation. *Am. J. Physiol.* *229*, 1165–1169.
- Glover, E.I., Martin, J., Maher, A., Thornhill, R.E., Moran, G.R., and Tarnopolsky, M.A. (2010). A randomized trial of coenzyme Q10 in mitochondrial disorders. *Muscle Nerve* *42*, 739–748.
- Goto, Y., Nonaka, I., and Horai, S. (1990). A mutation in the tRNA(Leu)(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* *348*, 651–653.
- Guerrero-Castillo, S., Baertling, F., Kownatzki, D., Wessels, H.J., Arnold, S., Brandt, U., and Nijtmans, L. (2017). The Assembly Pathway of Mitochondrial Respiratory Chain Complex I. *Cell Metab.* *25*, 128–139.
- Guidotti, A., Auta, J., Davis, J.M., Di-Giorgi-Gerevini, V., Dwivedi, Y., Grayson, D.R., Impagnatiello, F., Pandey, G., Pesold, C., Sharma, R., et al. (2000). Decrease in reelin and glutamic acid decarboxylase67 (GAD67) expression in schizophrenia and bipolar disorder: a postmortem brain study. *Arch. Gen. Psychiatry* *57*, 1061–1069.
- Haigis, M.C., Mostoslavsky, R., Haigis, K.M., Fahie, K., Christodoulou, D.C., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Karow, M., Blander, G., et al. (2006). SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell* *126*, 941–954.
- Haut, S., Brivet, M., Touati, G., Rustin, P., Lebon, S., Garcia-Cazorla, A., Saudubray, J.M., Boutron, A., Legrand, A., and Slama, A. (2003). A deletion in the human QP-C gene causes a complex III deficiency resulting in hypoglycaemia and lactic acidosis. *Hum. Genet.* *113*, 118–122.
- Herrero-Yraola, A., Bakhit, S.M., Franke, P., Weise, C., Schweiger, M., Jorcke, D., and Ziegler, M. (2001). Regulation of glutamate dehydrogenase by reversible ADP-ribosylation in mitochondria. *EMBO J.* *20*, 2404–2412.
- Hess, J.F., Parisi, M.A., Bennett, J.L., and Clayton, D.A. (1991). Impairment of mitochondrial transcription termination by a point mutation associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies. *Nature* *351*, 236–239.
- Hinson, J.T., Fantin, V.R., Schönberger, J., Breivik, N., Siem, G., McDonough, B., Sharma, P., Keogh, I., Godinho, R., Santos, F., et al. (2007). Missense mutations in the BCS1L gene as a cause of the Björnstad syndrome. *N. Engl. J. Med.* *356*, 809–819.
- Hirano, M., and Pavlakis, S.G. (1994). Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): current concepts. *J. Child Neurol.* *9*, 4–13.
- Hirano, M., Ricci, E., Koenigsberger, M.R., Defendini, R., Pavlakis, S.G., DeVivo, D.C., DiMauro, S., and Rowland, L.P. (1992). Melas: an original case and clinical criteria for diagnosis. *Neuromuscul. Disord.* *NMD* *2*, 125–135.
- Hohnholt, M.C., Andersen, V.H., Andersen, J.V., Christensen, S.K., Karaca, M., Maechler, P., and Waagepetersen, H.S. (2018). Glutamate dehydrogenase is essential to sustain neuronal oxidative energy metabolism during stimulation. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* *38*, 1754–1768.
- Holt, I.J., Harding, A.E., and Morgan-Hughes, J.A. (1988). Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* *331*, 717–719.

- Holt, I.J., Lorimer, H.E., and Jacobs, H.T. (2000). Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* *100*, 515–524.
- Horváth, R., Abicht, A., Holinski-Feder, E., Laner, A., Gempel, K., Prokisch, H., Lochmüller, H., Klopstock, T., and Jaksch, M. (2006). Leigh syndrome caused by mutations in the flavoprotein (Fp) subunit of succinate dehydrogenase (SDHA). *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* *77*, 74–76.
- Hwang, S., Ham, S., Lee, S.-E., Lee, Y., and Lee, G.H. (2018). Hypoxia regulates the level of glutamic acid decarboxylase enzymes and interrupts inhibitory synapse stability in primary cultured neurons. *NeuroToxicology* *65*, 221–230.
- Ihara, Y., Namba, R., Kuroda, S., Sato, T., and Shirabe, T. (1989). Mitochondrial encephalomyopathy (MELAS): pathological study and successful therapy with coenzyme Q10 and idebenone. *J. Neurol. Sci.* *90*, 263–271.
- Ikejiri, Y., Mori, E., Ishii, K., Nishimoto, K., Yasuda, M., and Sasaki, M. (1996). Idebenone improves cerebral mitochondrial oxidative metabolism in a patient with MELAS. *Neurology* *47*, 583–585.
- Ito, H., Mori, K., Harada, M., Minato, M., Naito, E., Takeuchi, M., Kuroda, Y., and Kagami, S. (2008). Serial brain imaging analysis of stroke-like episodes in MELAS. *Brain Dev.* *30*, 483–488.
- Jackson, C.B., Nuoffer, J.-M., Hahn, D., Prokisch, H., Haberberger, B., Gautschi, M., Häberli, A., Gallati, S., and Schaller, A. (2014). Mutations in SDHD lead to autosomal recessive encephalomyopathy and isolated mitochondrial complex II deficiency. *J. Med. Genet.* *51*, 170–175.
- Jacobs, H.T., and Turnbull, D.M. (2005). Nuclear genes and mitochondrial translation: a new class of genetic disease. *Trends Genet. TIG* *21*, 312–314.
- Jaeken, J., Casaer, P., Cock, P. de, Corbeel, L., Eeckels, R., Eggermont, E., Schechter, P.J., and Brucher, J.-M. (1984). Gamma-Aminobutyric Acid-Transaminase Deficiency: A Newly Recognized Inborn Error of Neurotransmitter Metabolism. *Neuropediatrics* *15*, 165–169.
- Jain-Ghai, S., Cameron, J.M., Maawali, A.A., Blaser, S., MacKay, N., Robinson, B., and Raiman, J. (2013). Complex II deficiency—A case report and review of the literature. *Am. J. Med. Genet. A.* *161*, 285–294.
- Janjua, N.A., Itano, T., Kugoh, T., Hosokawa, K., Nakano, M., Matsui, H., and Hatase, O. (1992). Familial increase in plasma glutamic acid in epilepsy. *Epilepsy Res.* *11*, 37–44.
- Jardel, C., and Rucheton, B. (2018). Diagnostic des maladies mitochondriales. *Rev. Francoph. Lab.* *2018*, 36–48.
- Javitt, D.C. (2004). Glutamate as a therapeutic target in psychiatric disorders. *Mol. Psychiatry* *9*, 984–997, 979.
- Jeppesen, T.D., Schwartz, M., Olsen, D.B., Wibrand, F., Krag, T., Dunø, M., Hauerslev, S., and Vissing, J. (2006). Aerobic training is safe and improves exercise capacity in patients with mitochondrial myopathy. *Brain J. Neurol.* *129*, 3402–3412.
- Ji, F., Kanbara, N., and Obata, K. (1999). GABA and histogenesis in fetal and neonatal mouse brain lacking both the isoforms of glutamic acid decarboxylase. *Neurosci. Res.* *33*, 187–194.
- Jin, L., Li, D., Alesi, G.N., Fan, J., Kang, H.-B., Lu, Z., Boggon, T.J., Jin, P., Yi, H., Wright, E.R., et al. (2015). Glutamate dehydrogenase 1 signals through antioxidant glutathione peroxidase 1 to regulate redox homeostasis and tumor growth. *Cancer Cell* *27*, 257–270.
- Jong, C.J., Azuma, J., and Schaffer, S. (2012). Mechanism underlying the antioxidant activity of taurine: prevention of mitochondrial oxidant production. *Amino Acids* *42*, 2223–2232.
- Kami, K., Fujita, Y., Igarashi, S., Koike, S., Sugawara, S., Ikeda, S., Sato, N., Ito, M., Tanaka, M., Tomita, M., et al. (2012). Metabolomic profiling rationalized pyruvate efficacy in cybrid cells harboring MELAS mitochondrial DNA mutations. *Mitochondrion* *12*, 644–653.

- Kanai, Y. (1997). Family of neutral and acidic amino acid transporters: molecular biology, physiology and medical implications. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 565–572.
- Kanavouras, K., Mastorodemos, V., Borompokas, N., Spanaki, C., and Plaitakis, A. (2007). Properties and molecular evolution of human GLUD2 (neural and testicular tissue-specific) glutamate dehydrogenase. *J. Neurosci. Res.* 85, 1101–1109.
- Kang, H.C., Kim, Y.J., Kim, D.W., and Kim, H.D. (2005). Efficacy and safety of the ketogenic diet for intractable childhood epilepsy: Korean multicentric experience. *Epilepsia* 46, 272–279.
- Kang, H.-C., Lee, Y.-M., Kim, H.D., Lee, J.S., and Slama, A. (2007). Safe and effective use of the ketogenic diet in children with epilepsy and mitochondrial respiratory chain complex defects. *Epilepsia* 48, 82–88.
- Karaca, M., Frigerio, F., Migrenne, S., Martin-Levilain, J., Skytt, D.M., Pajicka, K., Martin-del-Rio, R., Gruetter, R., Tamarit-Rodriguez, J., Waagepetersen, H.S., et al. (2015). GDH-Dependent Glutamate Oxidation in the Brain Dictates Peripheral Energy Substrate Distribution. *Cell Rep.* 13, 365–375.
- Karolewicz, B., Maciag, D., O'Dwyer, G., Stockmeier, C.A., Feyissa, A.M., and Rajkowska, G. (2010). Reduced level of glutamic acid decarboxylase-67 kDa in the prefrontal cortex in major depression. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13, 411–420.
- Kash, S.F., Johnson, R.S., Tecott, L.H., Noebels, J.L., Mayfield, R.D., Hanahan, D., and Baekkeskov, S. (1997). Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 14060–14065.
- Keith, H.M. (1933). FACTORS INFLUENCING EXPERIMENTALLY PRODUCED CONVULSIONS. *Arch. Neurol. Psychiatry* 29, 148–154.
- Keith, H.M., and Stavrazy, G.W. (1935). EXPERIMENTAL CONVULSIONS INDUCED BY ADMINISTRATION OF THUJONE: A PHARMACOLOGIC STUDY OF THE INFLUENCE OF THE AUTONOMIC NERVOUS SYSTEM ON THESE CONVULSIONS. *Arch. Neurol. Psychiatry* 34, 1022–1040.
- Kennedy, E.P., and Lehninger, A.L. (1949). Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J. Biol. Chem.* 179, 957–972.
- Kim, D.Y., Simeone, K.A., Simeone, T.A., Pandya, J.D., Wilke, J.C., Ahn, Y., Geddes, J.W., Sullivan, P.G., and Rho, J.M. (2015). Ketone Bodies Mediate Anti-Seizure Effects Through Mitochondrial Permeability Transition. *Ann. Neurol.* 78, 77–87.
- King, M.P., and Attardi, G. (1989). Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246, 500–503.
- Kirino, Y., Yasukawa, T., Ohta, S., Akira, S., Ishihara, K., Watanabe, K., and Suzuki, T. (2004). Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a human mitochondrial disease. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101, 15070–15075.
- Klivenyi, P., Ferrante, R.J., Matthews, R.T., Bogdanov, M.B., Klein, A.M., Andreassen, O.A., Mueller, G., Wermer, M., Kaddurah-Daouk, R., and Beal, M.F. (1999). Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Med.* 5, 347–350.
- Koenig, M.K., Hodgeman, R., Riviello, J.J., Chung, W., Bain, J., Chiriboga, C.A., Ichikawa, K., Osaka, H., Tsuji, M., Gibson, K.M., et al. (2017). Phenotype of GABA-transaminase deficiency. *Neurology* 88, 1919–1924.
- Koga, A., Koga, Y., Akita, Y., Fukiyama, R., Ueki, I., Yatsuga, S., and Matsuishi, T. (2003). Increased mitochondrial processing intermediates associated with three tRNA(Leu(UUR)) gene mutations. *Neuromuscul. Disord.* NMD 13, 259–262.
- Koga, Y., Davidson, M., Schon, E.A., and King, M.P. (1995). Analysis of cybrids harboring MELAS mutations in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *Muscle Nerve. Suppl.* 3, S119-123.

- Koga, Y., Yoshino, M., and Kato, H. (1998). MELAS exhibits dominant negative effects on mitochondrial RNA processing. *Ann. Neurol.* 43, 835.
- Koga, Y., Akita, Y., Nishioka, J., Yatsuga, S., Povalko, N., Tanabe, Y., Fujimoto, S., and Matsuishi, T. (2005). L-arginine improves the symptoms of stroke-like episodes in MELAS. *Neurology* 64, 710–712.
- Koga, Y., Akita, Y., Junko, N., Yatsuga, S., Povalko, N., Fukiyama, R., Ishii, M., and Matsuishi, T. (2006). Endothelial dysfunction in MELAS improved by L-arginine supplementation. *Neurology* 66, 1766–1769.
- Koga, Y., Akita, Y., Nishioka, J., Yatsuga, S., Povalko, N., Katayama, K., and Matsuishi, T. (2007). MELAS and L-arginine therapy. *Mitochondrion* 7, 133–139.
- Koga, Y., Povalko, N., Nishioka, J., Katayama, K., Yatsuga, S., and Matsuishi, T. (2012). Molecular pathology of MELAS and L-arginine effects. *Biochim. Biophys. Acta* 1820, 608–614.
- Koga, Y., Povalko, N., Inoue, E., Nakamura, H., Ishii, A., Suzuki, Y., Yoneda, M., Kanda, F., Kubota, M., Okada, H., et al. (2018). Therapeutic regimen of L-arginine for MELAS: 9-year, prospective, multicenter, clinical research. *J. Neurol.* 265, 2861–2874.
- Kremer, L.S., Bader, D.M., Mertes, C., Kopajtich, R., Pichler, G., Iuso, A., Haack, T.B., Graf, E., Schwarzmayr, T., Terrile, C., et al. (2017). Genetic diagnosis of Mendelian disorders via RNA sequencing. *Nat. Commun.* 8.
- Kugler, P., and Schmitt, A. (1999). Glutamate transporter EAAC1 is expressed in neurons and glial cells in the rat nervous system. *Glia* 27, 129–142.
- Kukat, C., Wurm, C.A., Spåhr, H., Falkenberg, M., Larsson, N.-G., and Jakobs, S. (2011). Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 13534–13539.
- Kumari, S., Mehta, S.L., and Li, P.A. (2012). Glutamate Induces Mitochondrial Dynamic Imbalance and Autophagy Activation: Preventive Effects of Selenium. *PLOS ONE* 7, e39382.
- Kutiyanawalla, A., Promsote, W., Terry, A., and Pillai, A. (2012). Cysteamine treatment ameliorates alterations in GAD67 expression and spatial memory in heterozygous reeler mice. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 15, 1073–1086.
- Kverneland, M., Selmer, K.K., Nakken, K.O., Iversen, P.O., and Taubøll, E. (2015). A prospective study of the modified Atkins diet for adults with idiopathic generalized epilepsy. *Epilepsy Behav.* EB 53, 197–201.
- Lai, J.C., Sheu, K.F., Kim, Y.T., Clarke, D.D., and Blass, J.P. (1986). The subcellular localization of glutamate dehydrogenase (GDH): is GDH a marker for mitochondria in brain? *Neurochem. Res.* 11, 733–744.
- Lang, A., and Rol (2017). Novel role of the SIRT4-OPA1 axis in mitochondrial quality control. *Cell Stress* 2, 1–3.
- Lee, Y.M., Kang, H.C., Lee, J.S., Kim, S.H., Kim, E.Y., Lee, S.K., Slama, A., and Kim, H.D. (2008). Mitochondrial respiratory chain defects: underlying etiology in various epileptic conditions. *Epilepsia* 49, 685–690.
- Lehre, K.P., Levy, L.M., Ottersen, O.P., Storm-Mathisen, J., and Danbolt, N.C. (1995). Differential expression of two glial glutamate transporters in the rat brain: quantitative and immunocytochemical observations. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 15, 1835–1853.
- Leman, G., Gueguen, N., Desquirit-Dumas, V., Kane, M.S., Wettervald, C., Chupin, S., Chevrollier, A., Lebre, A.-S., Bonnefont, J.-P., Barth, M., et al. (2015). Assembly defects induce oxidative stress in inherited mitochondrial complex I deficiency. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 65, 91–103.
- Lemke, J.R., Lal, D., Reinthaler, E.M., Steiner, I., Nothnagel, M., Alber, M., Geider, K., Laube, B., Schwake, M., Finsterwalder, K., et al. (2013). Mutations in GRIN2A cause idiopathic focal epilepsy with rolandic spikes. *Nat. Genet.* 45, 1067–1072.

- Levine, B., and Elazar, Z. (2011). Inheriting Maternal mtDNA. *Science* 334, 1069–1070.
- Lewerenz, J., and Maher, P. (2015). Chronic Glutamate Toxicity in Neurodegenerative Diseases—What is the Evidence? *Front. Neurosci.* 9.
- Li, D. (1998). Effects of iron deficiency on iron distribution and gamma-aminobutyric acid (GABA) metabolism in young rat brain tissues. *Hokkaido Igaku Zasshi* 73, 215–225.
- Li, M., Li, C., Allen, A., Stanley, C.A., and Smith, T.J. (2012). The structure and allosteric regulation of mammalian glutamate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* 519, 69–80.
- Li, M., Li, C., Allen, A., Stanley, C.A., and Smith, T.J. (2014). Glutamate Dehydrogenase: Structure, Allosteric Regulation, and Role in Insulin Homeostasis. *Neurochem. Res.* 39, 433–445.
- Liesa, M., Palacín, M., and Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol. Rev.* 89, 799–845.
- Liu, H., Yang, Y., Wang, Y., Tang, H., Zhang, F., Zhang, Y., and Zhao, Y. (2018). Ketogenic diet for treatment of intractable epilepsy in adults: A meta-analysis of observational studies. *Epilepsia Open* 3, 9–17.
- Lonlay, P. de, Valnot, I., Barrientos, A., Gorbatyuk, M., Tzagoloff, A., Taanman, J.-W., Benayoun, E., Chrétien, D., Kadhom, N., Lombès, A., et al. (2001). A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nat. Genet.* 29, 57–60.
- Lucas, D.R., and Newhouse, J.P. (1957). The toxic effect of sodium L-glutamate on the inner layers of the retina. *AMA Arch. Ophthalmol.* 58, 193–201.
- Luft, R., Ikkos, D., Palmieri, G., Ernster, L., and Afzelius, B. (1962). A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *J. Clin. Invest.* 41, 1776–1804.
- M, K., Kk, S., Ko, N., Po, I., and E, T. (2015). A prospective study of the modified Atkins diet for adults with idiopathic generalized epilepsy.
- Maalouf, M., Sullivan, P.G., Davis, L., Kim, D.Y., and Rho, J.M. (2007). Ketones inhibit mitochondrial production of reactive oxygen species production following glutamate excitotoxicity by increasing NADH oxidation. *Neuroscience* 145, 256–264.
- Malthankar-Phatak, G.H., de Lanerolle, N., Eid, T., Spencer, D.D., Behar, K.L., Spencer, S.S., Kim, J.H., and Lai, J.C.K. (2006). Differential glutamate dehydrogenase (GDH) activity profile in patients with temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 47, 1292–1299.
- Manwaring, N., Jones, M.M., Wang, J.J., Rohtchina, E., Howard, C., Mitchell, P., and Sue, C.M. (2007). Population prevalence of the MELAS A3243G mutation. *Mitochondrion* 7, 230–233.
- Martikainen, M.H., Päivärinta, M., Jääskeläinen, S., and Majamaa, K. (2012). Successful treatment of POLG-related mitochondrial epilepsy with antiepileptic drugs and low glycaemic index diet. *Epileptic Disord. Int. Epilepsy J. Videotape* 14, 438–441.
- Martin, D.L., and Rimvall, K. (1993a). Regulation of γ -Aminobutyric Acid Synthesis in the Brain. *J. Neurochem.* 60, 395–407.
- Martin, D.L., and Rimvall, K. (1993b). Regulation of gamma-aminobutyric acid synthesis in the brain. *J. Neurochem.* 60, 395–407.
- Mason, G.F., Gruetter, R., Rothman, D.L., Behar, K.L., Shulman, R.G., and Novotny, E.J. (1995). Simultaneous determination of the rates of the TCA cycle, glucose utilization, alpha-ketoglutarate/glutamate exchange, and glutamine synthesis in human brain by NMR. *J. Cereb. Blood Flow Metab. Off. J. Int. Soc. Cereb. Blood Flow Metab.* 15, 12–25.

- Melø, T.M., Nehlig, A., and Sonnewald, U. (2006). Neuronal-glia interactions in rats fed a ketogenic diet. *Neurochem. Int.* 48, 498–507.
- Mimaki, M., Wang, X., McKenzie, M., Thorburn, D.R., and Ryan, M.T. (2012). Understanding mitochondrial complex I assembly in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1817, 851–862.
- Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G., and Lippincott-Schwartz, J. (2009). A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 11960–11965.
- Mizuguchi, Y., Hatakeyama, H., Sueoka, K., Tanaka, M., and Goto, Y.-I. (2017). Low dose resveratrol ameliorates mitochondrial respiratory dysfunction and enhances cellular reprogramming. *Mitochondrion* 34, 43–48.
- Montoya, J., Gaines, G.L., and Attardi, G. (1983). The pattern of transcription of the human mitochondrial rRNA genes reveals two overlapping transcription units. *Cell* 34, 151–159.
- Morley, S.A., and Nielsen, B.L. (2017). Plant mitochondrial DNA. *Front. Biosci. Landmark Ed.* 22, 1023–1032.
- Murphy, T.H., Malouf, A.T., Sastre, A., Schnaar, R.L., and Coyle, J.T. (1988). Calcium-dependent glutamate cytotoxicity in a neuronal cell line. *Brain Res.* 444, 325–332.
- Nadler, J.V., Evenson, D.A., and Cuthbertson, G.J. (1981). Comparative toxicity of kainic acid and other acidic amino acids toward rat hippocampal neurons. *Neuroscience* 6, 2505–2517.
- Naini, A., Kaufmann, P., Shanske, S., Engelstad, K., De Vivo, D.C., and Schon, E.A. (2005). Hypocitrullinemia in patients with MELAS: an insight into the “MELAS paradox.” *J. Neurol. Sci.* 229–230, 187–193.
- Napolitano, A., Salvetti, S., Vista, M., Lombardi, V., Siciliano, G., and Giraldi, C. (2000). Long-term treatment with idebenone and riboflavin in a patient with MELAS. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 21, S981–982.
- Nass, S., and Nass, M.M.K. (1963). INTRAMITOCHONDRIAL FIBERS WITH DNA CHARACTERISTICS. *J. Cell Biol.* 19, 613–629.
- Neal, E.G., Chaffe, H., Schwartz, R.H., Lawson, M.S., Edwards, N., Fitzsimmons, G., Whitney, A., and Cross, J.H. (2008). The ketogenic diet for the treatment of childhood epilepsy: a randomised controlled trial. *Lancet Neurol.* 7, 500–506.
- Nijtmans, L.G.J., Ugalde, C., van den Heuvel, L.P., and Smeitink, J.A.M. (2004). Function and dysfunction of the oxidative phosphorylation system. In *Mitochondrial Function and Biogenesis*, (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 149–176.
- Nissim, I., Brosnan, M.E., Yudkoff, M., Nissim, I., and Brosnan, J.T. (1999). Studies of Hepatic Glutamine Metabolism in the Perfused Rat Liver with 15N-Labeled Glutamine. *J. Biol. Chem.* 274, 28958–28965.
- Noe, N., Dillon, L., Lellek, V., Diaz, F., Hida, A., Moraes, C.T., and Wenz, T. (2013). Bezafibrate improves mitochondrial function in the CNS of a mouse model of mitochondrial encephalopathy. *Mitochondrion* 13, 417–426.
- Ohsawa, Y., Hagiwara, H., Nishimatsu, S.-I., Hirakawa, A., Kamimura, N., Ohtsubo, H., Fukai, Y., Murakami, T., Koga, Y., Goto, Y.-I., et al. (2019). Taurine supplementation for prevention of stroke-like episodes in MELAS: a multicentre, open-label, 52-week phase III trial. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 90, 529–536.
- Olney, J.W. (1986). Inciting excitotoxic cytochrome among central neurons. *Adv. Exp. Med. Biol.* 203, 631–645.
- Olney, J.W., and Ho, O.L. (1970). Brain damage in infant mice following oral intake of glutamate, aspartate or cysteine. *Nature* 227, 609–611.

- Olney, J.W., and Sharpe, L.G. (1969). Brain lesions in an infant rhesus monkey treated with monosodium glutamate. *Science* *166*, 386–388.
- Otera, H., and Mihara, K. (2011). Molecular mechanisms and physiologic functions of mitochondrial dynamics. *J. Biochem. (Tokyo)* *149*, 241–251.
- Palade, G.E. (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* *1*, 188–211.
- Palaiologos, G., and Felig, P. (1976). Effects of ketone bodies on amino acid metabolism in isolated rat diaphragm. *Biochem. J.* *154*, 709–716.
- Patten, B.M., Harati, Y., Acosta, L., Jung, S.S., and Felmus, M.T. (1978). Free amino acid levels in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* *3*, 305–309.
- Patton, J.R., Bykhovskaya, Y., Mengesha, E., Bertolotto, C., and Fischel-Ghodsian, N. (2005). Mitochondrial myopathy and sideroblastic anemia (MLASA): missense mutation in the pseudouridine synthase 1 (PUS1) gene is associated with the loss of tRNA pseudouridylation. *J. Biol. Chem.* *280*, 19823–19828.
- Pavlakakis, S.G., Phillips, P.C., DiMauro, S., De Vivo, D.C., and Rowland, L.P. (1984a). Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann. Neurol.* *16*, 481–488.
- Pavlakakis, S.G., Phillips, P.C., DiMauro, S., De Vivo, D.C., and Rowland, L.P. (1984b). Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: a distinctive clinical syndrome. *Ann. Neurol.* *16*, 481–488.
- Peterson, P.E., and Smith, T.J. (1999). The structure of bovine glutamate dehydrogenase provides insights into the mechanism of allostery. *Struct. Lond. Engl.* *1993* *7*, 769–782.
- Picard, M., and McEwen, B.S. (2018). Psychological Stress and Mitochondria: A Systematic Review. *Psychosom. Med.* *80*, 141–153.
- Plaitakis, A., and Caroscio, J.T. (1987). Abnormal glutamate metabolism in amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* *22*, 575–579.
- Plaitakis, A., Metaxari, M., and Shashidharan, P. (2000). Nerve tissue-specific (GLUD2) and housekeeping (GLUD1) human glutamate dehydrogenases are regulated by distinct allosteric mechanisms: implications for biologic function. *J. Neurochem.* *75*, 1862–1869.
- Plaitakis, A., Latsoudis, H., Kanavouras, K., Ritz, B., Bronstein, J.M., Skoula, I., Mastorodemos, V., Papapetropoulos, S., Borompokas, N., Zaganas, I., et al. (2010). Gain-of-function variant in GLUD2 glutamate dehydrogenase modifies Parkinson's disease onset. *Eur. J. Hum. Genet.* *18*, 336–341.
- Plaitakis, A., Kalef-Ezra, E., Kotzamani, D., Zaganas, I., and Spanaki, C. (2017). The Glutamate Dehydrogenase Pathway and Its Roles in Cell and Tissue Biology in Health and Disease. *Biology* *6*.
- Pow, D.V., and Barnett, N.L. (2000). Developmental expression of excitatory amino acid transporter 5: a photoreceptor and bipolar cell glutamate transporter in rat retina. *Neurosci. Lett.* *280*, 21–24.
- Pronicka, E., Piekutowska-Abramczuk, D., Ciara, E., Trubicka, J., Rokicki, D., Karkucińska-Więckowska, A., Pajdowska, M., Jurkiewicz, E., Halat, P., Kosińska, J., et al. (2016). New perspective in diagnostics of mitochondrial disorders: two years' experience with whole-exome sequencing at a national paediatric centre. *J. Transl. Med.* *14*.
- Przedborski, S., Jackson-Lewis, V., Muthane, U., Jiang, H., Ferreira, M., Naini, A.B., and Fahn, S. (1993). Chronic levodopa administration alters cerebral mitochondrial respiratory chain activity. *Ann. Neurol.* *34*, 715–723.

- Qi, J., Kim, M., Sanchez, R., Ziaee, S.M., Kohtz, J.D., and Koh, S. (2018). Enhanced susceptibility to stress and seizures in GAD65 deficient mice. *PLoS One* *13*, e0191794.
- Rahman, S. (2012). Mitochondrial disease and epilepsy. *Dev. Med. Child Neurol.* *54*, 397–406.
- Raizen, D.M., Brooks-Kayal, A., Steinkrauss, L., Tennekoon, G.I., Stanley, C.A., and Kelly, A. (2005). Central nervous system hyperexcitability associated with glutamate dehydrogenase gain of function mutations. *J. Pediatr.* *146*, 388–394.
- Rawi, S.A., and Galy, V. (2012). L'alophaie, ou comment l'embryon élimine les mitochondries et autres organites paternels. *médecine/sciences* *28*, 343–346.
- Rhein, V., Song, X., Wiesner, A., Ittner, L.M., Baysang, G., Meier, F., Ozmen, L., Bluethmann, H., Dröse, S., Brandt, U., et al. (2009). Amyloid- β and tau synergistically impair the oxidative phosphorylation system in triple transgenic Alzheimer's disease mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 20057–20062.
- Rikimaru, M., Ohsawa, Y., Wolf, A.M., Nishimaki, K., Ichimiya, H., Kamimura, N., Nishimatsu, S., Ohta, S., and Sunada, Y. (2012). Taurine ameliorates impaired mitochondrial function and prevents stroke-like episodes in patients with MELAS. *Intern. Med. Tokyo Jpn.* *51*, 3351–3357.
- Rodriguez, M.C., MacDonald, J.R., Mahoney, D.J., Parise, G., Beal, M.F., and Tarnopolsky, M.A. (2007). Beneficial effects of creatine, CoQ10, and lipoic acid in mitochondrial disorders. *Muscle Nerve* *35*, 235–242.
- Rojas, J.C., Saavedra, J.A., and Gonzalez-Lima, F. (2008). Neuroprotective effects of memantine in a mouse model of retinal degeneration induced by rotenone. *Brain Res.* *1215*, 208–217.
- Rothstein, J.D., Martin, L.J., and Kuncl, R.W. (1992). Decreased glutamate transport by the brain and spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *326*, 1464–1468.
- Rothstein, J.D., Martin, L., Levey, A.I., Dykes-Hoberg, M., Jin, L., Wu, D., Nash, N., and Kuncl, R.W. (1994). Localization of neuronal and glial glutamate transporters. *Neuron* *13*, 713–725.
- Rothstein, J.D., Dykes-Hoberg, M., Pardo, C.A., Bristol, L.A., Jin, L., Kuncl, R.W., Kanai, Y., Hediger, M.A., Wang, Y., Schielke, J.P., et al. (1996). Knockout of glutamate transporters reveals a major role for astroglial transport in excitotoxicity and clearance of glutamate. *Neuron* *16*, 675–686.
- Rötig, A. (2010). Genetic bases of mitochondrial respiratory chain disorders. [/data/revues/12623636/v36i2/S1262363609002572/](https://doi.org/10.1002/revue.12623636/v36i2/S1262363609002572).
- Sakuta, R., and Nonaka, I. (1989). Vascular involvement in mitochondrial myopathy. *Ann. Neurol.* *25*, 594–601.
- Santra, S., Gilkerson, R.W., Davidson, M., and Schon, E.A. (2004). Ketogenic treatment reduces deleted mitochondrial DNAs in cultured human cells. *Ann. Neurol.* *56*, 662–669.
- Sasarman, F., Antonicka, H., and Shoubridge, E.A. (2008). The A3243G tRNA^{Leu}(UUR) MELAS mutation causes amino acid misincorporation and a combined respiratory chain assembly defect partially suppressed by overexpression of EFTu and EFG2. *Hum. Mol. Genet.* *17*, 3697–3707.
- Scarpelli, M., Zappini, F., Filosto, M., Russignan, A., Tonin, P., and Tomelleri, G. (2012). Mitochondrial Sensorineural Hearing Loss: A Retrospective Study and a Description of Cochlear Implantation in a MELAS Patient. *Genet. Res. Int.* *2012*.
- Schaffer, S.W., Jong, C.J., Ito, T., and Azuma, J. (2014). Role of taurine in the pathologies of MELAS and MERRF. *Amino Acids* *46*, 47–56.
- Schon, E.A., Koga, Y., Davidson, M., Moraes, C.T., and King, M.P. (1992). The mitochondrial tRNA^(Leu)(UUR) mutation in MELAS: a model for pathogenesis. *Biochim. Biophys. Acta* *1101*, 206–209.

- Schon, E.A., DiMauro, S., and Hirano, M. (2012). Human mitochondrial DNA: roles of inherited and somatic mutations. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 878–890.
- Schwarcz, R., and Coyle, J.T. (1977). Striatal lesions with kainic acid: neurochemical characteristics. *Brain Res.* *127*, 235–249.
- Sepkuty, J.P., Cohen, A.S., Eccles, C., Rafiq, A., Behar, K., Ganel, R., Coulter, D.A., and Rothstein, J.D. (2002). A neuronal glutamate transporter contributes to neurotransmitter GABA synthesis and epilepsy. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *22*, 6372–6379.
- Sharma, L.K., Lu, J., and Bai, Y. (2009). Mitochondrial Respiratory Complex I: Structure, Function and Implication in Human Diseases. *Curr. Med. Chem.* *16*, 1266–1277.
- Shih, J., Liu, L., Mason, A., Higashimori, H., and Donmez, G. (2014). Loss of SIRT4 decreases GLT-1-dependent glutamate uptake and increases sensitivity to kainic acid. *J. Neurochem.* *131*, 573–581.
- Shy, G.M., and Gonatas, N.K. (1964). HUMAN MYOPATHY WITH GIANT ABNORMAL MITOCHONDRIA. *Science* *145*, 493–496.
- Skladal, D., Halliday, J., and Thorburn, D.R. (2003). Minimum birth prevalence of mitochondrial respiratory chain disorders in children. *Brain* *126*, 1905–1912.
- Smeitink, J.A., Zeviani, M., Turnbull, D.M., and Jacobs, H.T. (2006a). Mitochondrial medicine: a metabolic perspective on the pathology of oxidative phosphorylation disorders. *Cell Metab.* *3*, 9–13.
- Smeitink, J.A.M., Elpeleg, O., Antonicka, H., Diepstra, H., Saada, A., Smits, P., Sasarman, F., Vriend, G., Jacob-Hirsch, J., Shaag, A., et al. (2006b). Distinct clinical phenotypes associated with a mutation in the mitochondrial translation elongation factor EFTs. *Am. J. Hum. Genet.* *79*, 869–877.
- Smith, A.C., and Robinson, A.J. (2016). MitoMiner v3.1, an update on the mitochondrial proteomics database. *Nucleic Acids Res.* *44*, D1258–1261.
- Smith, E.L., Austen, B.M., Blumenthal, K.M., and Nyc, J.F. (1975). 5 Glutamate Dehydrogenases. P.D. Boyer, ed. (Academic Press), pp. 293–367.
- Sofou, K., Dahlin, M., Hallböök, T., Lindefeldt, M., Viggedal, G., and Darin, N. (2017). Ketogenic diet in pyruvate dehydrogenase complex deficiency: short- and long-term outcomes. *J. Inherit. Metab. Dis.* *40*, 237–245.
- Sohm, B., Frugier, M., Brulé, H., Olszak, K., Przykorska, A., and Florentz, C. (2003). Towards understanding human mitochondrial leucine aminoacylation identity. *J. Mol. Biol.* *328*, 995–1010.
- Spanaki, C., Zaganas, I., Kleopa, K.A., and Plaitakis, A. (2010). Human GLUD2 glutamate dehydrogenase is expressed in neural and testicular supporting cells. *J. Biol. Chem.* *285*, 16748–16756.
- Sproule, D.M., and Kaufmann, P. (2008). Mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: basic concepts, clinical phenotype, and therapeutic management of MELAS syndrome. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1142*, 133–158.
- Stanley, C.A., Lieu, Y.K., Hsu, B.Y., Burlina, A.B., Greenberg, C.R., Hopwood, N.J., Perlman, K., Rich, B.H., Zammarchi, E., and Poncz, M. (1998). Hyperinsulinism and hyperammonemia in infants with regulatory mutations of the glutamate dehydrogenase gene. *N. Engl. J. Med.* *338*, 1352–1357.
- Steriade, C., Andrade, D.M., Faghfoury, H., Tarnopolsky, M.A., and Tai, P. (2014). Mitochondrial encephalopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS) may respond to adjunctive ketogenic diet. *Pediatr. Neurol.* *50*, 498–502.
- Taivassalo, T., and Haller, R.G. (2004). Implications of exercise training in mtDNA defects--use it or lose it? *Biochim. Biophys. Acta* *1659*, 221–231.

- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., et al. (1997). Epilepsy and Exacerbation of Brain Injury in Mice Lacking the Glutamate Transporter GLT-1. *Science* 276, 1699–1702.
- Taneja, V., Mishra, K., and Agarwal, K.N. (1986). Effect of Early Iron Deficiency in Rat on the γ -Aminobutyric Acid Shunt in Brain. *J. Neurochem.* 46, 1670–1674.
- Tang, S., Wang, J., Zhang, V.W., Li, F.-Y., Landsverk, M., Cui, H., Truong, C.K., Wang, G., Chen, L.C., Graham, B., et al. (2013). Transition to Next Generation Analysis of the Whole Mitochondrial Genome: A Summary of Molecular Defects. *Hum. Mutat.* 34, 882–893.
- Tarnopolsky, M.A. (2011). Creatine as a therapeutic strategy for myopathies. *Amino Acids* 40, 1397–1407.
- Taylor, R.W., Birch-Machin, M.A., Schaefer, J., Taylor, L., Shakir, R., Ackrell, B.A., Cochran, B., Bindoff, L.A., Jackson, M.J., Griffiths, P., et al. (1996). Deficiency of complex II of the mitochondrial respiratory chain in late-onset optic atrophy and ataxia. *Ann. Neurol.* 39, 224–232.
- Thompson, K., Collier, J.J., Glasgow, R.I.C., Robertson, F.M., Pyle, A., Blakely, E.L., Alston, C.L., Oláhová, M., McFarland, R., and Taylor, R.W. (2020). Recent advances in understanding the molecular genetic basis of mitochondrial disease. *J. Inherit. Metab. Dis.* 43, 36–50.
- Thurston, J.H., Hauhart, R.E., and Schiro, J.A. (1986). Beta-hydroxybutyrate reverses insulin-induced hypoglycemic coma in suckling-weanling mice despite low blood and brain glucose levels. *Metab. Brain Dis.* 1, 63–82.
- Toompuu, M., Tiranti, V., Zeviani, M., and Jacobs, H. (1999). Molecular Phenotype of the np 7472 Deafness-Associated Mitochondrial Mutation in Osteosarcoma Cell Cybrids. *Hum. Mol. Genet.* 8, 2275–2283.
- Tsuji, M., Aida, N., Obata, T., Tomiyasu, M., Furuya, N., Kurosawa, K., Errami, A., Gibson, K.M., Salomons, G.S., Jakobs, C., et al. (2010). A new case of GABA transaminase deficiency facilitated by proton MR spectroscopy. *J. Inherit. Metab. Dis.* 33, 85–90.
- Uusimaa, J., Moilanen, J.S., Vainionpää, L., Tapanainen, P., Lindholm, P., Nuutinen, M., Löppönen, T., Mäki-Torkko, E., Rantala, H., and Majamaa, K. (2007). Prevalence, segregation, and phenotype of the mitochondrial DNA 3243A>G mutation in children. *Ann. Neurol.* 62, 278–287.
- Visapää, I., Fellman, V., Vesa, J., Dasvarma, A., Hutton, J.L., Kumar, V., Payne, G.S., Makarow, M., Van Coster, R., Taylor, R.W., et al. (2002). GRACILE syndrome, a lethal metabolic disorder with iron overload, is caused by a point mutation in BCS1L. *Am. J. Hum. Genet.* 71, 863–876.
- Wai, T., and Langer, T. (2016). Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends Endocrinol. Metab.* 27, 105–117.
- Wallace, D.C., Singh, G., Lott, M.T., Hodge, J.A., Schurr, T.G., Lezza, A.M., Elsas, L.J., and Nikoskelainen, E.K. (1988). Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 242, 1427–1430.
- Wallace, D.C., Fan, W., and Procaccio, V. (2010). Mitochondrial energetics and therapeutics. *Annu. Rev. Pathol.* 5, 297–348.
- Waterham, H.R., Koster, J., van Roermund, C.W.T., Mooyer, P.A.W., Wanders, R.J.A., and Leonard, J.V. (2007). A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N. Engl. J. Med.* 356, 1736–1741.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 872.
- Wolff, J.N., and Gemmell, N.J. (2008). Lost in the zygote: the dilution of paternal mtDNA upon fertilization. *Heredity* 101, 429–434.

- Wortmann, S.B., Koolen, D.A., Smeitink, J.A., van den Heuvel, L., and Rodenburg, R.J. (2015). Whole exome sequencing of suspected mitochondrial patients in clinical practice. *J. Inherit. Metab. Dis.* *38*, 437–443.
- Wredenberg, A., Wibom, R., Wilhelmsson, H., Graff, C., Wiener, H.H., Burden, S.J., Oldfors, A., Westerblad, H., and Larsson, N.-G. (2002). Increased mitochondrial mass in mitochondrial myopathy mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 15066–15071.
- Yamada, K., Watanabe, M., Shibata, T., Tanaka, K., Wada, K., and Inoue, Y. (1996). EAAT4 is a post-synaptic glutamate transporter at Purkinje cell synapses. *Neuroreport* *7*, 2013–2017.
- Yamamoto, H., and Mohanan, P.V. (2003). Effect of alpha-ketoglutarate and oxaloacetate on brain mitochondrial DNA damage and seizures induced by kainic acid in mice. *Toxicol. Lett.* *143*, 115–122.
- Yang, X., Qian, P., Xu, X., Liu, X., Wu, X., Zhang, Y., and Yang, Z. (2018). GRIN2A mutations in epilepsy-aphasia spectrum disorders. *Brain Dev.* *40*, 205–210.
- Yatsuga, S., Povalko, N., Nishioka, J., Katayama, K., Kakimoto, N., Matsuishi, T., Kakuma, T., Koga, Y., and Taro Matsuoka for MELAS Study Group in Japan (2012). MELAS: a nationwide prospective cohort study of 96 patients in Japan. *Biochim. Biophys. Acta* *1820*, 619–624.
- Yoo, D.Y., Kim, W., Kim, D.W., Yoo, K.-Y., Chung, J.Y., Youn, H.Y., Yoon, Y.S., Choi, S.Y., Won, M.-H., and Hwang, I.K. (2011). Pyridoxine enhances cell proliferation and neuroblast differentiation by upregulating the GABAergic system in the mouse dentate gyrus. *Neurochem. Res.* *36*, 713–721.
- Yudkoff, M., Nelson, D., Daikhin, Y., and Erecińska, M. (1994). Tricarboxylic acid cycle in rat brain synaptosomes. Fluxes and interactions with aspartate aminotransferase and malate/aspartate shuttle. *J. Biol. Chem.* *269*, 27414–27420.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Grunstein, R., and Nissim, I. (1997). Effects of ketone bodies on astrocyte amino acid metabolism. *J. Neurochem.* *69*, 682–692.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Lazarow, A., and Nissim, I. (2001). Ketogenic diet, amino acid metabolism, and seizure control. *J. Neurosci. Res.* *66*, 931–940.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Nissim, I., Horyn, O., Lazarow, A., Luhovyy, B., Wehrli, S., and Nissim, I. (2005). Response of brain amino acid metabolism to ketosis. *Neurochem. Int.* *47*, 119–128.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Melø, T.M., Nissim, I., Sonnewald, U., and Nissim, I. (2007). The ketogenic diet and brain metabolism of amino acids: relationship to the anticonvulsant effect. *Annu. Rev. Nutr.* *27*, 415–430.
- Yudkoff, M., Daikhin, Y., Horyn, O., Nissim, I., and Nissim, I. (2008). Ketosis and Brain Handling of Glutamate, Glutamine and GABA. *Epilepsia* *49*, 73–75.
- Yum, M.-S., Lee, M., Woo, D.-C., Kim, D.W., Ko, T.-S., and Velíšek, L. (2015). β -Hydroxybutyrate attenuates NMDA-induced spasms in rats with evidence of neuronal stabilization on MR spectroscopy. *Epilepsy Res.* *117*, 125–132.
- Zeharia, A., Shaag, A., Pappo, O., Mager-Heckel, A.-M., Saada, A., Beinat, M., Karicheva, O., Mandel, H., Ofek, N., Segel, R., et al. (2009). Acute Infantile Liver Failure Due to Mutations in the TRMU Gene. *Am. J. Hum. Genet.* *85*, 401–407.
- Züchner, S., Mersyanova, I.V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E.L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J., et al. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* *36*, 449–451.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	7
1. La mitochondrie : généralités	9
1.1. Historique	9
1.2. Origine endosymbiotique	9
1.3. Structure	11
1.3.1. La membrane externe	11
1.3.2. La membrane interne	11
1.3.3. L'espace intermembranaire	11
1.3.4. La matrice	13
1.3.5. Organisation	13
a) Mécanismes moléculaires de la dynamique mitochondriale	13
b) Modification des acteurs moléculaires de la dynamique mitochondriale et pathologies	15
2. La mitochondrie centre de production d'énergie	17
2.1. La glycolyse	17
2.2. La voie des pentoses phosphates	19
2.3. Le métabolisme des acides aminés	19
2.3.1. La transamination	21
a) L'aspartate aminotransférase (AST)	21
b) Alanine aminotransférase (ALT)	21
2.3.2. La désamination oxydative	23
a) Composition et localisation	23
b) Régulation	25
c) Fonction	25
d) GDH et Pathologies	27
2.4. Le cycle de krebs	29
2.5. Les corps cétoniques	31
3. La chaîne oxydative mitochondriale	31
3.1. Fonctionnement	31
3.2. Composition	33
3.2.1. Le complexe I : NADH Ubiquinone Oxydo-réductase	33
a) Composition du complexe I	33
b) Assemblage du complexe I	35
3.2.2. Le complexe II : Succinate Ubiquinone Oxydo réductase	35
3.2.3. Le complexe III : L'ubiquinol cytochrome c réductase	35
3.2.4. Le complexe IV : Cytochrome C oxydase	37
3.2.5. L'ATP synthase	37
4. Le génome mitochondrial	39

4.1.	Composition du génome mitochondrial humain	39
4.2.	Réplication de l'ADN mitochondrial	41
4.2.1.	Modèle de réplication asynchrone	41
4.2.2.	Modèle de réplication synchrone.....	41
4.3.	Transmission maternelle.....	41
4.4.	Concept de l'hétéroplasmie et ségrégation mitotique	43
5.	Les pathologies mitochondriales	43
5.1.	Pathologies du génome mitochondrial	45
5.1.1.	Les mutations ponctuelles de l'ADNmt	45
	a) Défaut de synthèse des protéines de la chaîne respiratoire	45
	b) Mutations des ARNt et ARNr.....	47
5.1.2.	Les délétions uniques de l'ADNmt.....	47
5.2.	Pathologie de l'ADN nucléaire.....	47
5.2.1.	Gènes impliqués dans la structure et l'assemblage des différents complexes de la chaîne mitochondriale.....	49
5.2.2.	Gènes impliqués dans la synthèse des protéines mitochondriales.....	51
5.2.3.	Gènes impliqués dans le maintien du génome mitochondrial	51
5.3.	Diagnostic des maladies mitochondriales.....	51
5.3.1.	Antécédents familiaux et symptômes.....	51
5.3.2.	Examens paracliniques	53
5.3.3.	Examens métaboliques.....	53
5.3.4.	Analyse tissulaire.....	53
5.3.5.	Analyse génétique	55
5.3.6.	L'essor de l'utilisation des technologies OMICs dans le diagnostic des pathologies mitochondriales... ..	55
	a) La génomique.....	55
	b) La transcriptomique	57
	c) La protéomique	59
	d) La métabolomique	59
6.	Le syndrome MELAS	63
6.1.	Critères diagnostics du syndrome MELAS	65
6.2.	Aspects cliniques du syndrome MELAS	65
6.2.1.	Manifestations neurologiques principales.....	65
6.2.2.	Manifestations musculaires	67
6.2.3.	Acidose lactique.....	67
6.2.4.	Autres manifestations cliniques	67
6.3.	Physiopathologie du syndrome MELAS	69
6.3.1.	Dysfonction du métabolisme oxydatif.....	69
	a) Transcription de l'ARNt Leu (UUR) et MELAS	69
	b) Structure et stabilisation de l'ARNt Leu (UUR).....	69
	c) Synthèse protéique	71

6.3.2.	Angiopathie relative à une carence en NO	71
6.4.	Thérapies.....	73
6.4.1.	Aspects thérapeutiques	73
	a) Traitements symptomatiques	73
	b) Traitements visant à restaurer la fonction énergétique mitochondriale	75
6.5.	Modèles d'études	79
7.	Altération du métabolisme des acides aminés dans les pathologies	79
7.1.1.	Rôles du glutamate	81
	a) Glutamate un acide aminé neurotransmetteur excitateur	81
	b) Autres rôles du glutamate.....	83
7.1.2.	Le glutamate est au carrefour des voies métaboliques.....	83
7.1.3.	Rôles du Glutamate dans les pathologies	85
	a) Les phénomènes d'excitotoxicité	85
	b) Glutamate et épilepsie.....	87
7.1.4.	Corps cétoniques et métabolisme du glutamate/GABA	89
	a) Le régime cétogène.....	89
	b) Formation des corps cétoniques : la cétogenèse et métabolisme neuronal	91
	c) Exemple de l'application du régime cétogène dans certaines pathologies	91
	d) Implication des corps cétoniques sur le métabolisme du glutamate et GABA	93
	PROBLEMATIQUE	97
	RESULTATS	101
1.	Amélioration du métabolisme oxydatif, ainsi que l'assemblage et activité du complexe I dans les cybrides MELAS suite à un traitement avec les corps cétoniques	103
1.1.	Introduction	103
1.2.	Article	105
1.3.	Résultats/Discussion et Perspectives.....	117
	a) Confirmation d'un métabolisme oxydatif altéré dans les cybrides MELAS	117
	b) Amélioration de la respiration mitochondriale et du métabolisme oxydatif des cybrides MELAS après traitement avec les corps cétoniques	117
	c) Amélioration de l'assemblage du complexe I de la chaîne mitochondriale et augmentation de la quantité d'ADNmt après traitement par les corps cétoniques dans les cybrides MELAS.....	118
2.	Réduction des intermédiaires d'assemblage du complexe I via la restriction calorique dans les cybrides MELAS	121
2.1.	Introduction	121
2.2.	Article	123
2.3.	Résultats/ Discussion et Perspectives.....	143
2.3.1.	Analyse du défaut d'assemblage du complexe I dans les cybrides MELAS	143
2.3.2.	Réduction des intermédiaires d'assemblage, associé à une amélioration du métabolisme oxydatif dans les cybrides MELAS sous restriction glucidique	143
3.	Le glutamate un acide aminé clé dans le MELAS	145
3.1.	Introduction	145

3.2.	Article	147
3.3.	Résultats/ Discussion et Perspectives.....	201
3.3.1.	Mise en évidence d'une signature métabolique pour les cybrides MELAS.....	201
3.3.2.	La concentration de glutamate est augmentée en lien avec le déficit du complexe I dans les cybrides MELAS	202
3.3.3.	Les corps cétoniques restaurent à la fois une concentration intracellulaire normale du glutamate mais également améliorent les fonctions mitochondriales et le réseau mitochondrial des cybrides MELAS.....	203
3.3.4.	Altération des voies du métabolisme impliquant le glutamate dans le syndrome MELAS	204
	a) Exemple des cybrides MELAS	204
	b) Confirmation du rôle du glutamate à partir de tissus autopsiques de cerveau d'un patient MELAS	205
3.3.5.	Mise en évidence d'une dysfonction du cycle de Krebs améliorée après exposition aux corps cétoniques dans les cybrides MELAS.	209
	DISCUSSION GENERALE	211
1.	Apport de nos études sur la physiopathologie du MELAS	213
1.1.1.	Défaut d'assemblage et d'activité du complexe I entraînant un défaut oxydatif de la cellule et impact sur les processus de biogénèse et mitophagie via l'utilisation de stratégies métaboliques.....	213
1.1.2.	Intérêt des outils multi-omiques dans la découverte de nouveaux acteurs dans la physiopathologie du MELAS	214
2.	Apports diagnostiques et thérapeutiques pour le syndrome MELAS	214
2.1.	Le glutamate marqueur potentiel du syndrome MELAS ?.....	215
2.1.1.	Analyse du glutamate à partir de plasmas de patients MELAS	215
2.1.2.	Conclusion et perspectives.....	216
2.2.	Identification de cibles visant le glutamate et/ou les voies métaboliques impliquant le glutamate ...	216
	CONCLUSION	219
	BIBLIOGRAPHIE	223
	TABLE DES ILLUSTRATIONS	245
	TABLE DES TABLEAUX.....	247

Table des illustrations

FIGURE 1 : La structure de la mitochondrie	10
FIGURE 2 : La dynamique mitochondriale.....	12
FIGURE 3 : Les différentes étapes de la dynamique mitochondriale.....	14
FIGURE 4 : La glycolyse.	16
FIGURE 5 : Le métabolisme des acides aminés.	18
FIGURE 6 : Mécanismes de transamination.....	20
FIGURE 7 : Réaction de transamination réalisée par l’alanine aminotransférase (ALT) et l’aspartate aminotransférase (AST).....	20
FIGURE 8 : Structure tridimensionnelle de la glutamate déshydrogénase (GDH)	22
FIGURE 9 : Régulation de la glutamate déshydrogénase (GDH)	24
FIGURE 10 : Le cycle de krebs (CK).....	28
FIGURE 11 : La cétogénèse.....	30
FIGURE 12 : Représentation schématique de la structure du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale	32
FIGURE 13 : Représentation schématique du processus d’assemblage du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale. D’après (Guerrero-Castillo et al., 2017)	34
FIGURE 14 : La chaîne de la phosphorylation oxydative mitochondriale (OXPHOS).	36
FIGURE 15 : Le génome mitochondrial humain (ADNmt).....	38
FIGURE 16 : Le concept de la ségrégation mitochondriale et de l’hétéroplasmie.	42
FIGURE 17 : Représentation schématique des organes les plus touchés lors de pathologies mitochondriales avec leurs signes cliniques associés. D’après (Bris et al., 2018)	44
FIGURE 18 : Représentation schématique des différentes pathologies associées aux différentes mutations de l’ADNmt. D’après (DiMauro, 2004).....	46
FIGURE 19 : Liste des gènes impliqués dans des pathologies mitochondriales.	48
FIGURE 20 : Caractéristiques radiologiques du syndrome MELAS.	64
FIGURE 21 : Caractéristiques histopathologiques du syndrome de MELAS.....	66
FIGURE 22 : Modification post-transcriptionnelle associée à la mutation m.3243A>G.....	68
FIGURE 23 : Génération des cellules cybrides	78
FIGURE 24 : Le glutamate : un métabolite au carrefour des voies métaboliques.....	82

FIGURE 25 : Métabolisme hépatique et cérébral des corps cétoniques.	90
FIGURE 26 : Cycle d'activation et de désactivation de GAD	207
FIGURE 27 : Analyse du niveau de glutamate dans le plasma de patients MELAS et de contrôles (ctrl).	215

Table des tableaux

Tableau 1 : Tableau des différentes mutations retrouvées dans le syndrome MELAS. 62

RÉSUMÉ

La mitochondrie centrale énergétique de nos cellules possède son propre génome ou ADN mitochondrial (ADNmt) présent en de nombreuses copies par cellule. Les mutations de l'ADNmt sont responsables de maladies mitochondriales comme le syndrome neurovasculaire MELAS. La coexistence de copies d'ADNmt mutées et normales définit le concept d'hétéroplasmie en lien direct avec la symptomatologie et la sévérité de cette maladie. Parmi les mutations MELAS de l'ADNmt, le variant m.3243A>G est le plus fréquemment rencontré. Afin de mieux comprendre la physiopathologie de ce syndrome et proposer des approches thérapeutiques, nous disposons d'un modèle cybride neuronal qui porte différents niveaux d'hétéroplasmies pour le variant m.3243A>G. Nous avons montré une dysfonction sévère de la chaîne respiratoire, associée à un défaut sévère d'assemblage en particulier du complexe I mitochondrial. L'utilisation d'une approche multi-omiques nous a permis d'identifier un profil biochimique spécifique au syndrome MELAS avec une modification de la voie du glutamate conduisant à une accumulation significative de ce métabolite au niveau extra et intra-cellulaire. L'exposition de corps cétoniques comme stratégie métabolique à visée thérapeutique entraîne une réduction majeure du glutamate et une amélioration significative des fonctions mitochondriales, modulant également les métabolites intermédiaires du cycle de Krebs. La stratégie multi-omiques nous a aidé à comprendre les mécanismes de la dysfonction mitochondriale, et a permis d'identifier le glutamate comme marqueur potentiel de ce syndrome. Cela démontre aussi l'intérêt de stratégies métaboliques comme thérapies dans le syndrome MELAS et les maladies mitochondriales.

mots-clés : Maladies mitochondriales- ADN mitochondrial - Syndrome MELAS- Hétéroplasmie mitochondriale- Régime cétogène- Complexe I- Glutamate- Stratégies Omiques

ABSTRACT

Mitochondria have its own genome or mitochondrial DNA (mtDNA) present in many copies/cell. Mutations in mtDNA will therefore be responsible for mitochondrial diseases such as MELAS neurovascular syndrome. The coexistence of mutated and normal mtDNA copies defines the concept of heteroplasmy correlated with the symptoms and severity of these diseases. Among mtDNA mutations, the m.3243A>G variant is commonly found associated with MELAS syndrome. In order to better understand the pathophysiology of this syndrome, using neuronal cybrid models carrying different mutant loads for the variant m.3243A>G, we have shown a severe dysfunction of the respiratory chain, associated with a severe defect of assembly in particular of the mitochondrial complex I. The use of a multi-omics approach has also allowed us to identify a specific biochemical profile of MELAS syndrome affecting in particular the glutamate pathway with a significant accumulation of this metabolite. Ketone bodies exposure of MELAS cell models as a therapeutic metabolic strategy resulted in a drastic reduction in glutamate and a significant improvement in mitochondrial functions, also modulating intermediate metabolites of the Krebs cycle. The multi-omics strategy has helped us understand the mechanisms of mitochondrial dysfunction, and has identified glutamate as a potential marker of this syndrome. It also demonstrates the value of metabolic strategies as therapies in MELAS syndrome and mitochondrial diseases.

keywords: Mitochondrial Diseases- Mitochondrial DNA- MELAS Syndrome- Mitochondrial Heteroplasmy- Ketogenic Diet- Complex I- Glutamate- Omic Strategies

Présidence de l'université
40 rue de rennes - BP 73532
49035 Angers cedex
Tél. 02 41 96 23 23 | Fax 02 41 96 23 00

ENGAGEMENT DE NON PLAGIAT

Je, soussigné(e) BELAL Sophie

déclare être pleinement conscient(e) que le plagiat de documents ou d'une partie d'un document publiée sur toutes formes de support, y compris l'internet, constitue une violation des droits d'auteur ainsi qu'une fraude caractérisée.

En conséquence, je m'engage à citer toutes les sources que j'ai utilisées pour écrire ce rapport ou mémoire.

**Cet engagement de non plagiat doit être signé et joint
à tous les rapports, dossiers, mémoires.**



Présidence de l'université
40 rue de rennes – BP 73532

université
angers

Titre : Impact du glutamate et des voies de signalisations associées dans la physiopathologie du syndrome MELAS révélé par une approche multi-omiques et corrigé par l'utilisation des corps cétoniques

Mots clés : Syndrome MELAS, Hétéroplasmie Mitochondriale, Glutamate, stratégies Omiques, Régime cétogène, Complexe I

Résumé : La mitochondrie centrale énergétique de nos cellules possède son propre génome ou ADN mitochondrial (ADNmt) présent en de nombreuses copies par cellule. Les mutations de l'ADNmt sont responsables de maladies mitochondriales comme le syndrome neurovasculaire MELAS. La coexistence de copies d'ADNmt mutées et normales définit le concept d'hétéroplasmie en lien direct avec la symptomatologie et la sévérité de cette maladie. Parmi les mutations MELAS de l'ADNmt, le variant m.3243A>G est le plus fréquemment rencontré. Afin de mieux comprendre la physiopathologie de ce syndrome et proposer des approches thérapeutiques, nous disposons d'un modèle cybrides neuronal qui porte différents niveaux d'hétéroplasmies pour le variant m.3243A>G. Nous avons montré une dysfonction sévère de la chaîne respiratoire, associée à un défaut sévère d'assemblage en particulier du complexe I mitochondrial.

L'utilisation d'une approche multi-omiques nous a permis d'identifier un profil biochimique spécifique au syndrome MELAS avec une modification de la voie du glutamate conduisant à une accumulation significative de ce métabolite au niveau extra et intra-cellulaire. L'exposition de corps cétoniques comme stratégie métabolique à visée thérapeutique entraîne une réduction majeure du glutamate et une amélioration significative des fonctions mitochondriales, modulant également les métabolites intermédiaires du cycle de Krebs. La stratégie multi-omiques nous a aidé à comprendre les mécanismes de la dysfonction mitochondriale, et a permis d'identifier le glutamate comme marqueur potentiel de ce syndrome. Cela démontre aussi l'intérêt de stratégies métaboliques comme thérapies dans le syndrome MELAS et les maladies mitochondriales.

Title : Impact of glutamate and associated signaling pathways in the physiopathology of MELAS syndrome revealed by a multi-omics approach and corrected by the use of ketone bodies

Keywords : MELAS Syndrome, mitochondrial heteroplasmy, Glutamate, Omics strategy, Ketogenic Diet, Complex I

Abstract: Mitochondria have its own genome or mitochondrial DNA (mtDNA) present in many copies/cell. Mutations in mtDNA will therefore be responsible for mitochondrial diseases such as MELAS neurovascular syndrome. The coexistence of mutated and normal mtDNA copies defines the concept of heteroplasmy correlated with the symptoms and severity of these diseases. Among mtDNA mutations, the m.3243A>G variant is commonly found associated with MELAS syndrome. In order to better understand the pathophysiology of this syndrome, using neuronal cybrid models carrying different mutant loads for the variant m.3243A>G, we have shown a severe dysfunction of the respiratory chain, associated with a severe defect of assembly in particular of the mitochondrial complex I.

The use of a multi-omics approach has also allowed us to identify a specific biochemical profile of MELAS syndrome affecting in particular the glutamate pathway with a significant accumulation of this metabolite.

Ketone body exposure of MELAS cell models as a therapeutic metabolic strategy resulted in a drastic reduction in glutamate and a significant improvement in mitochondrial functions, also modulating intermediate metabolites of the Krebs cycle. The multi-omics strategy has helped us understand the mechanisms of mitochondrial dysfunction, and has identified glutamate as a potential marker of this syndrome. It also demonstrates the value of metabolic strategies as therapies in MELAS syndrome and mitochondrial diseases.