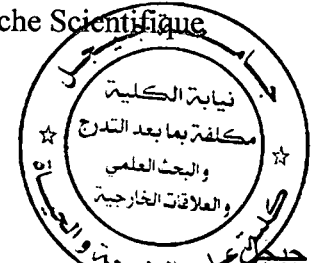


جامعة جيجل  
المكتبة المركزية  
TH-813

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

574/1

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



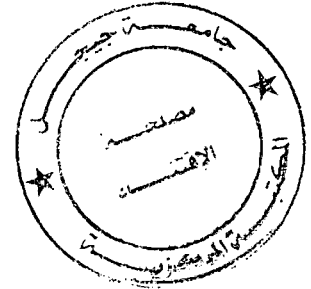
Université de Jijel  
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie Moléculaire et Cellulaire

جامعة جيجل  
كلية علوم الطبيعة و الحياة  
قسم البيولوجيا الجزيئية و الخلوية

Mémoire pour l'obtention du diplôme de Magistère  
En Biologie Moléculaire et Cellulaire

Option : Toxicologie Moléculaire

**Thème**



**Modélisation d'une approche de thérapie Anti-génomique  
d'une maladie humaine MELAS (Mitochondrial  
Encephalopathy, Lactic Acidos, Stroke-Like episode)  
causée par des mutations dans l'ADN mitochondrial**

**Présenté par:**

BOUCHEHAM Abdeldjalil

**Soutenu le 07 Juin 2014 devant le jury composé de:**

Président :	IDOUI Tayeb	(MCA, Université de Jijel)
Rapporteur :	LAHOUEL Mesbah	(Prof, Université de Jijel)
Examineurs :	NAÏMI Dalila	(Prof, Université de Constantine)
	RECHRECHE Hocine	(MCA, Université de Jijel)

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

« ... أَنِّي رَأَيْتُ أَنَّهُ لَا يَكْتُبُ إِنْسَانٌ كِتَابًا فِي يَوْمِهِ إِلَّا قَالَ فِي غَدِهِ:

لَوْ غَيْرَ هَذَا لَكَانَ أَحْسَنَ،

وَلَوْ قَدَّمَ هَذَا لَكَانَ أَفْضَلَ، وَلَوْ زِيدَ كَذَا لَكَانَ يُسْتَحْسَنُ،

وَلَوْ تَرَكَ هَذَا لَكَانَ أَجْمَلَ؛ وَهَذَا مِنْ أَعْظَمِ الْعِبَرِ،

وَهُوَ دَلِيلٌ عَلَى اسْتِيْلَاءِ النَّقْصِ عَلَى جُمْلَةِ الْبَشَرِ»<sup>1</sup>

<sup>1</sup> كُتِبَ أُسْتَاذُ الْبَلْغَاءِ الْقَاضِي الْقَاضِي عَبْدُ الرَّحْمَنِ الْبَيْسَاتِيُّ إِلَى الْعَمَادِ الْأَضْفَهَائِيِّ مُعْتَذِرًا مِنْ كَلَامِ اسْتَعْرَاكِهِ عَلَيْهِ .

# Sommaire

REMERCIEMENTS.....	5
ABREVIATIONS .....	6
INTRODUCTION GENERALE.....	8

## Première Partie

### RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE

#### Chapitre 1

##### GENERALITES SUR LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES

1. La mitochondrie: de la production de l'énergie à l'apoptose.....	13
2. L'ADN mitochondrial: Organisation et Fonction.....	15
2.1. Organisation.....	15
2.2. Génome mitochondrial humain.....	16
2.3. Transcription de l'ADNmt .....	17
2.4. Réplication de l'ADN mt.....	18
2.5. Réparation et Maintenance de L'ADNmt.....	19

#### Chapitre 2

##### MALADIES MITOCHONDRIALES

1. Introduction .....	22
2. Les maladies mitochondriales liées aux mutations de l'ADNmt.....	23
2.1. Caractéristiques générales.....	23
2.1.1. Homoplasmie et hétéroplasmie.....	23
2.1.2. Ségrégation mitotique de l'ADNmt.....	24
2.1.3. Hérité maternelle de l'ADNmt .....	24
2.2. Types de Mutation .....	24

2.2.1.	Les mutations ponctuelles de l'ADNmt.....	24
2.2.2.	Les remaniements de l'ADN mt .....	28

### Chapitre 3

#### THERAPIE GENIQUE DES MALADIES MITOCHONDRIALES

1.	Introduction .....	30
2.	Approche anti-génomique .....	30
3.	Expression allotopique des protéines codées par l'ADN mt.....	31
4.	Import d'ARN dans les mitochondries et thérapie génique .....	32
5.	Objectif du stage de Magistère.....	34

### Deuxième Partie

#### MATÉRIELS et METHODES

1.	Techniques de Culture cellulaire.....	38
1.1.	Culture cellulaire .....	38
1.2.	Transfection des cellules en cultures.....	39
2.	Extraction et analyse NORTHERN-BLOT de l'ARN total .....	40
3.	Western Blotting.....	41
4.	Test de l'activité enzymatique des complexes I et IV .....	44
5.	Mesure de la consommation d'oxygène (respiration cellulaire) .....	45

### Chapitre 2

#### RESULTATS

1.	Analyse de l'importation mitochondriale des ARN <sup>Leu</sup> recombinants .....	48
2.	Etude comparative des protéines mitochondriales de différentes lignées cellulaires.....	49
3.	Activité enzymatique des complexes I et IV .....	52
4.	Analyse de la respiration cellulaire .....	54

Chapitre 3

DISCUSSION

CONCLUSION.....	60
Références Bibliographiques .....	61

## REMERCIEMENTS

Si l'on me demande d'écrire un livre, un poème, un discours ça m'a été facile de le faire, mais écrire des remerciements, c'est un examen qui me serait difficile à accomplir. Car c'est tout d'abord une reconnaissance, hélas les mots ne peuvent guère l'exprimer comme il se doit. Mais la personne qui ne remercie pas les gens ne remerciera pas ALLAH, une parole rapportée du prophète.

Je remercie ALLAH de m'avoir donné le courage et la patience de finir ce travail.

Je tiens tous d'abord à remercier les membres de jury d'avoir accepté de juger ce modeste travail et pour leur disponibilité et. MERCI

J'adresse ma profonde reconnaissance au Dr LAHOUEL Mesbah pour son soutien sans faille tout au long de cette aventure, pour ces encouragements, pour sa patience et pour sa générosité. MERCI

Je suis également reconnaissant au Dr TARASSOV qui, tout au long des différents travaux de recherches réalisés dans son laboratoire, a su m'orienter, m'aider et surtout me faire confiance.

Je n'oublierai pas le Dr Nina Entelis, qui, elle aussi, m'a aidé tout au long de mes stages, pour ses critiques objectives, pour ces encouragements.

Mes remerciements s'adressent aussi au membre du laboratoire du Dr LAHOUEL et ceux des laboratoires de recherche du Département de Biologie de l'université Jijel pour leur enthousiasme, leurs disponibilités et pour leur gentillesse et générosité que j'ai pu découvrir lors de mon passage à Jijel pour mettre en œuvre mes expériences. Cela a créé une ambiance familière je VOUS REMERCIE TOUS.

Mes remerciements s'adressent également à Ali GAWHER, doctorant au TARASSOV's lab. Pour les journées passées au labo pour nos discussions pour les moments formidables. Cela m'a permis d'améliorer mon anglais et surtout d'aller au devant dans mon travail de recherche.

Je tiens à remercier également les membres du TARASSOV's lab. pour leur aide qui m'a été très utile.

Je n'oublierais pas d'adresser mes remerciements à mes parents et mes frères et à ma femme.

Enfin je remercie toute personne qui m'a aidé à réaliser ce travail.

MERCI A TOUS !!!

## ABREVIATIONS

BET : Bromure d'éthidium

BSA : Sérumalbumine bovine

CBS : conserved sequence blocks

dNTP : désoxyribonucléotide-5'-triphosphate

dCTP : désoxycytidine-5'-triphosphate

DMEM : Dulbecco's modified Eagles medium

DTT : dithiothréitol

HSP : Heavy strand promoter

KSS : Kearns Sayre Syndrome

MELAS : Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis and Stroke-like episodes

MERFF : Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Muscle Fibers

MPTP : 1 - méthyle 4 - phényl 1,2,3,6-tétrahydro pyridine

MTRPOL : Mitochondrial RNA polymerase

MTS : Mitochondrial targeting sequence

NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form

NCR : Non coding region

NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide

NARP : Neuropathy ataxia and retinis pigmentosa

PCR : Polymerase chaine reaction

PEO : Ophtalmoplegie progressive externe

PNA : Peptide nucleic acid

PNPASE : polynucleotide phosphorylase

POLG : ADN polymerase  $\gamma$  mitochondriale

RIC : RNA import complex

ROS : Reactive oxygen species



RNase : Ribonucléase  
RNasine : Inhibiteur de ribonucléase  
SDS : Sodium dodécylsulfate  
SSC : Standard sodium citrate  
SSB : Single Strand DNA Binding Protein  
TAE : Tris acétate EDTA  
TAS : termination-associated sequence  
TBE : Tris borate EDTA  
TFAM : Mitochondrial transcription factor A  
TIM : Translocase of inner membrane  
TOM : Translocase of outer membrane  
TRK1 : ARNt Lys CUU de levure  
TRK2 : ARNt Lys UUU de levure  
TRK3 : ARNt Lys UUU de levure mitochondrial  
UTR : Untranslated region  
VDAC : Voltage Dependant Anion Channel

# **INTRODUCTION GENERALE**

Les mitochondries sont des organites eucaryotiques qui participent à plusieurs voies métaboliques. Une de leurs fonctions principales est la production d'énergie cellulaire sous forme d'ATP par phosphorylation oxydative effectuée par la chaîne respiratoire. Ces organites sont aussi impliqués dans l'induction de l'apoptose et dans le vieillissement. Le dysfonctionnement des mitochondries peut engendrer de graves maladies neurodégénératives humaines.

L'ADN mitochondrial humain est un ADN circulaire codant pour des ARNt de transfert, des ARNr ribosomiques et des protéines mitochondriales qui entrent dans la composition des sous-unités de la chaîne respiratoire. Tandis que les protéines codées par l'ADN nucléaire sont importées dans l'organite, elles sont essentielles pour assurer les différentes fonctions intra-mitochondriales. Le bon fonctionnement de la mitochondrie nécessite donc une coordination de l'ADNmt et de l'ADN nucléaire.

La voie d'import des protéines dans les mitochondries est bien étudiée. Il existe également une voie d'import des acides nucléiques dans les mitochondries.

Les anomalies de l'ADNmt sont à l'origine de plusieurs maladies humaines. Il a été montré que l'ADNmt est un site inépuisable de mutations délétères associées à de divers syndromes. Plus de 200 mutations (substitutions, insertions, délétions, réarrangements) ont été associées à des pathologies humaines.

Différentes approches de thérapie biochimique ont été testées pour les maladies mitochondriales. Cependant, ces stratégies n'ont pas pu pallier ces anomalies d'une manière efficace et durable. La thérapie génique semble offrir une alternative pour traiter les pathologies causées par des mutations de l'ADNmt. Il existe plusieurs approches possibles dans ce contexte. La première serait l'expression allotopique des protéines qui consiste à adresser dans les mitochondries des protéines mitochondriales chimériques exprimées dans le génome nucléaire. La deuxième approche, dite «anti-génomique», serait basée sur la capacité des agents synthétiques (par exemple les PNA: peptides nucleic acids) à inhiber sélectivement la réplication d'un ADNmt muté, en favorisant la propagation de l'ADNmt sauvage. Enfin, une troisième approche est basée sur l'adressage des ARN de transfert dans les mitochondries humaines, où cet import a été utilisé pour compléter des mutations dans les gènes codant pour des ARNt mitochondriaux. Cette dernière approche a été réalisée au laboratoire d'accueil. En effet, Les gènes mitochondriaux codant pour l'ARNtLeu et

l'ARNt<sup>Lys</sup> sont des points chauds mutationnels. Ils sont associés aux syndromes MELAS (myopathie, encéphalopathie, acidose lactique, accidents vasculaires cérébraux) et MERRF (Epilepsie myoclonique à fibres rouges en lambeaux), respectivement. La fréquence de ces maladies est assez importante, >1:10,000.

Tarassov et ses collègues ont démontré que l'ARNt<sup>Lys</sup> recombinant importé du cytosol vers les mitochondries humaines, pouvant compléter une mutation MERRF. Par conséquent, ils ont observé une restauration partielle des fonctions mitochondriales. Après le succès de cette première approche, les auteurs ont essayé de modéliser une autre approche de thérapie génique basée sur le même principe que celle réalisée auparavant, mais cette fois-ci en étudiant la mutation dans le gène codant l'ARNt<sup>Leu</sup>

Ceci dit, l'objectif principal de l'étude a été de modéliser une approche de thérapie génique basée sur l'import de l'ARNt recombinant dans les mitochondries humaines et de tester l'effet de ces ARN sur les fonctions mitochondriales des cellules humaines en culture. Donc la tâche qui m'était confiée durant le stage peut se résumer en trois points :

- L'optimisation des méthodes moléculaires d'analyses des protéines mitochondriales.
- La caractérisation et la comparaison des fonctions mitochondriales des cellules en culture (mutées et sauvages).
- L'approbation du modèle cellulaire utilisé pour l'étude des anomalies mitochondriales.

Mon travail était donc reparti sur plusieurs chapitres, dont un consacré à une analyse bibliographique non exhaustive de tout ce qui concerne les mitochondries, leurs génétiques, leurs rôles ainsi les différentes maladies qui y sont associées. A la fin j'ai pu donner un aperçu sur les différents traitements utilisés et le rôle de la thérapie génique dans ce domaine. D'autre part, j'ai entamé la partie pratique ayant trait aux différentes techniques utilisées, suivi des résultats obtenus et de leurs interprétations. Ce rapport se termine par une conclusion et une ouverture concernant les perspectives attendues suite à cette étude.

**Première Partie**  
**RAPPEL BIBLIOGRAPHIQUE**

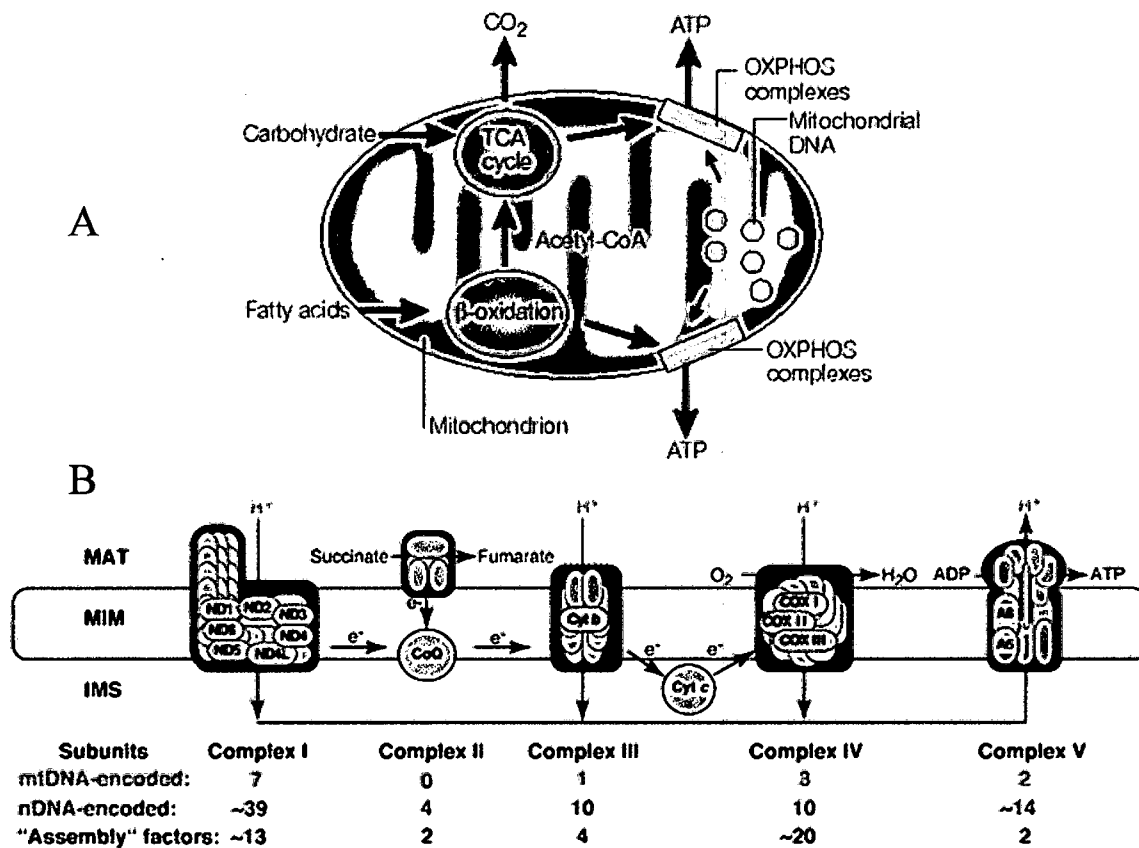
**Chapitre 1**

**GENERALITES SUR LES FONCTIONS  
MITOCHONDRIALES**

## 1. La mitochondrie: de la production de l'énergie à l'apoptose

Les mitochondries sont des organites intracellulaires présents dans toutes les cellules eucaryotes. Elles remplissent plusieurs fonctions vitales pour l'homéostasie cellulaire, allant d'importantes fonctions métaboliques, production de l'ATP, métabolisme du fer, l'oxydation des acides gras, à la participation aux événements de signalisation cellulaire via l'apoptose et la modulation du métabolisme mitochondrial en réponse à la demande bioénergétique cellulaire (Wallace 2005).

Aujourd'hui, les mitochondries sont considérées comme des organites dynamiques et adaptables, organisées en réseau et qui peuvent se déplacer le long du cytosquelette, fusionner ou se diviser. Les mitochondries sont composées d'une matrice protégée par deux membranes séparées par un espace inter membranairè. La membrane externe contient des canaux transmembranaires VDAC (Voltage-Dependant Anion Chanel) la rendant semi perméable en permettant le passage de molécules de taille inférieures à 1à KDa (anions, cations, nucléotides et métabolites comme les acides gras et le pyruvate). Les protéines sont quant à elles transloquées via le complexe TOM (Translocase of the Outer Membrane) situé au niveau des zones de contact entre les membranes interne et externe. La membrane interne est repliée en multiples crêtes qui peuvent adapter leur nombre en fonction de l'activité de la chaîne respiratoire. La composition lipidique est particulière car riche en cardiolipine et phosphatidylcholine qui jouent un rôle dans le maintient d'une conformation fonctionnelle du système de la phosphorylation oxydative «OXPHOS». Ce système est formé de 85 protéines différentes organisées en cinq complexes: quatre complexes redox incluant NADH: Coenzyme Q oxydoréductase (Complexe I), Succinate Déshydrogénase (Complexe II), Ubiquinol-Cytochrome *c* oxydoréductase (Complexe III), le Cytochrome *c* Oxydase (Complexe IV) et l'ATP Synthase (Complexe V) **figure 1a**. Les électrons fournis par FADH<sub>2</sub> et NADH tout au début de la chaine respiratoire, qui ont été générés à travers la Glycolyse et/ou l'oxydation des acides gras et l'oxydation consécutive dans le Cycle de Krebs, sont transférés par le biais de réactions d'oxydoréduction séquentielles jusqu'au complexe IV où ils sont finalement acceptés par une molécule d'Oxygène réduite en eau. Ce flux d'électrons génère un gradient de protons entre la matrice mitochondriale et l'espace inter membranairè utilisé par l'ATP Synthase pour produire de l'ATP à partir de l'ADP et Pi (Saraste 1999) .



**Figure 1: Rôle des mitochondries et l'ADNmt dans la production d'énergie.**

A. L'ADNmt fournit plusieurs protéines de la chaîne respiratoire (Taylor and Turnbull 2005).  
 B. Représentation schématique de la chaîne respiratoire humaine, pour plus de détails voir le texte.  
 Les sous unités codées par l'ADNn sont en bleu cyan et les sous unités codées par l'ADNmt sont en plusieurs couleurs (Schon, DiMauro et al. 2010).

L'ensemble de ce processus est d'une redoutable efficacité permettant de fournir près de 95% de l'énergie cellulaire, ainsi les mitochondries sont considérées comme les centrales énergétiques de la cellule. Toutefois, la chaîne respiratoire n'est pas un dispositif entièrement parfait, 0,2% de l'oxygène consommé durant la respiration n'étant pas totalement réduit en eau mais en un intermédiaire oxygéné réactif  $O_2^-$ , au niveau des complexes I et III de la chaîne respiratoire. Cet anion est converti par la manganèse superoxyde dismutase en peroxyde d'hydrogène  $H_2O_2$  pouvant lui-même être converti par la suite en ion hydroxyle  $OH^-$  hautement réactif (St-Pierre, Buckingham et al. 2002). Ces intermédiaires, connus sous le nom de radicaux libres ou ROS (Reactive Oxygen Species), sont toxiques pour la cellule, générant des dommages notamment envers l'ADNmt, localisé à proximité de la membrane interne de la mitochondrie.



Les mitochondries sont aussi impliquées dans de nombreuses fonctions essentielles. Cet organe est la source du Cluster Fer-Soufre et de l'hème qui sont utilisés par les protéines dans la cellule dans divers importants processus (Lill, Dutkiewicz et al. 2006). Plusieurs étapes de la synthèse des stéroïdes se passent dans les mitochondries (Payne and Hales 2004). Les mitochondries stockent en collaboration avec le réticulum endoplasmique le  $Ca^{2+}$  et participent à l'homéostasie du calcium ainsi qu'à la signalisation cellulaire, et plus particulièrement à la mort cellulaire programmée l'Apoptose.

L'apoptose est un mécanisme utilisé par la cellule pour éliminer les cellules non appropriées dans trois circonstances majeures: le développement et l'homéostasie, comme un mécanisme de défense contre les cellules potentiellement tumorigènes et génétiquement endommagées et dans la sénescence et le vieillissement. Ce phénomène a été identifié dans la plupart des organismes eucaryotes cellulaires. Les mitochondries jouent un rôle clé dans le déclenchement et l'amplification des événements de l'apoptose (Desagher and Martinou 2000). Les facteurs mitochondriaux qui peuvent déclencher l'apoptose sont la surcharge en calcium, l'exposition simultanée aux radicaux libres ou encore la diminution de la capacité énergétique. Plusieurs protéines pro-apoptotiques sont localisées dans l'espace inter-membranaire. Parmi elles, le cytochrome c qui permet l'activation en cascade des caspases, ce qui conduit au rétrécissement de la cellule, la dégradation de la chromatine, la fragmentation nucléaire, la perte de l'intégrité de la membrane plasmique et finalement la mort cellulaire. Ces événements se passent quand le pore de transition et de perméabilité s'ouvrent, pore non-sélectif à large conductance formé au niveau des points de contact entre des membranes internes et externes de la mitochondrie, ce qui permet la diffusion du Cytochrome c, accompagné de l'arrêt de la phosphorylation oxydative et l'effondrement du potentiel transmembranaire ( $\Delta\Psi$ ). Ainsi, compte tenu de son rôle fondamental dans les processus cellulaires, le dysfonctionnement des mitochondries peut engendrer de graves maladies humaines surtout neurodégénératives et musculaires (Wallace 2005).

## **2. L'ADN mitochondrial: Organisation et Fonction**

### **2.1.Organisation**

Les mitochondries contiennent leur propre ADN (ADN<sub>mt</sub>). L'explication de l'existence du génome réside dans le fait que les mitochondries seraient le résultat de l'endocytose, il y a environ 2 milliards d'années, d'une  $\alpha$ -proteobactérie par une cellule eucaryote. Cette théorie

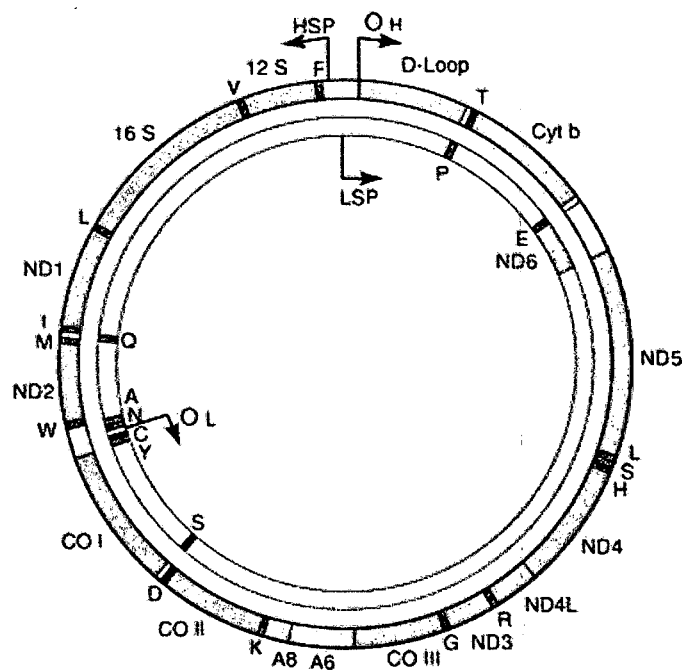
est dite endosymbiotique. Au cours de l'évolution, une large portion des gènes mitochondriaux a été éliminée, d'autres ont été transférés vers le noyau (le plus souvent des gènes codant pour des protéines) et d'autres ont été remplacés par des gènes nucléaires (le plus souvent des gènes codant pour les ARNt), ceci rend les mitochondries totalement dépendantes du noyau. L'ADNmt peut être ainsi de forme circulaire ou linéaire, simple ou double brin et avoir une taille pouvant aller de 6 Kb chez *Plasmodium falciparum* à plus de 2000 Kb chez certaines plantes terrestre (Sagan 1967). Ces différences de taille ne sont de plus pas forcément corrélées à la capacité codante des génomes. Le nombre des gènes mitochondriaux codant pour des protéines varient d'une dizaine à 67 dans différentes espèces, quant à ceux codant pour des ARNt varient de 0 à 27. Malgré ces variations, il existe des gènes universels, c'est-à-dire, ils sont présent dans tous les génomes mitochondriaux. C'est le cas concernant les gènes codant pour l'ARNr 12S, l'ARNr 16S, Cytochrome b, et le cytochrome c oxydase 1 (COX1). Il existe plusieurs hypothèses expliquant le fait que les mitochondries ont gardé leur système génétique, dont l'expression et la maintenance nécessitent plusieurs protéines impliquées dans la réplication la réparation, la recombinaison, la transcription, la maturation des ARNs, la traduction et les régulations des gènes qui sont importées du cytosol. Une repose sur le fait que l'import des protéines à travers les membranes de la mitochondrie serait rendu difficile par leur grande hydrophobicité. Une autre cause avancée serait que le transfert de ces gènes pourrait être entravé par la différence de code génétique engendrant une potentielle perte de fonction de la protéine s'il avait eu lieu. Une autre hypothèse concernant la rétention des gènes dans les mitochondries est le fait que les produits de ces gènes seraient toxiques pour la cellule une fois dans le cytosol (Adams and Palmer 2003).

## **2.2.Génome mitochondrial humain**

Les mitochondries humaines ont un ADN (ADNmt) circulaire double brin de 16569 pb, il est le premier génome à avoir été séquencé. Il représente 0.5-1% de l'ADN total dans la plupart des cellules. Ainsi, une cellule, dépendant du tissu; peut contenir plus de 1000 copies. Ces différentes molécules d'ADN sont organisées dans la matrice mitochondriale sous forme d'une structure appelée nucléoïde regroupant 2 à 10 copies d'ADNmt associées à plusieurs protéines (Iborra, Kimura et al. 2004, Legros, Malka et al. 2004).

L'ADNmt est composé de deux brins superenroulés de densités différentes sur le gradient de chlorure de césium, le brin lourd H « Heavy-Strand » riche en en GC, et le brin léger L

«Light Strand» riche en AT. Très compact et sans introns, l'ADNmt ne contient que deux régions non codantes, la région NCR (Non Coding Region) et l'origine de la réplication du brin L. Les gènes mitochondriaux sont répartis sur les deux brins de l'ADNmt. Ce dernier code pour les ARN ribosomiaux (12S et 16S) et 22 ARNt nécessaires pour la traduction de 13 protéines essentielles à la chaîne respiratoire. Elles incluent sept polypeptides du complexe I, une protéine du complexe III, trois protéines du complexe IV et deux protéines du complexe V. Les autres protéines de la chaîne respiratoire et la majorité des facteurs essentiels pour le maintien de la réplication et de l'expression de l'ADNmt, sont exprimés dans le noyau et ensuite importés du cytoplasme, ce qui rend cet organelle entièrement dépendant du noyau.



**Figure 2: L'ADN mitochondrial humain,** représentation des gènes codant pour les 13 protéines, les 22 ARNt et les 2 ARNr 16s et 12s. Voir le texte pour plus de détails concernant les significations des différentes abréviations (Schon, DiMauro et al. 2010).

### 2.3. Transcription de l'ADNmt

La transcription de l'ADNmt humain débute au niveau de la région non codante NCR qui contient le promoteur du brin H HSP (Heavy Strand Promoter) et celui du brin L (Light Strand Promoter). La synthèse de l'ARNm est réalisée par la polymérase MTRPOL (Mitochondrial RNA Polymérase) en présence du TFAM et TFB2M (Mitochondrial

Transcription Factor B). La transcription du brin H débute en deux sites très proches, HSP1 et HSP2, générant deux transcrits polycistroniques (Montoya, Christianson et al. 1982). Le promoteur HSP1 est responsable de la transcription des deux ARNr. La transcription à partir HSP2 quant à lui, génère un transcrit polycistronique couvrant la totalité du brin H. Le promoteur LSP est initié quant à lui la synthèse d'un seul transcrit comportant 8 ARNt et un ARNm (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003). La maturation des transcrits repose sur le clivage des ARNt. En effet, ces derniers sont disposés de façon adjacente à chaque ARN messenger et ribosomiaux. C'est leur repliement en ARNt qui engendre leur clivage par les RNase P et Z permettant la production des différents ARN (Ojala et al, 1981). Les ARN, sont ensuite polyadénylés en 3' et les ARNt subissent des modifications post-transcriptionnelles sur certaines de leurs bases et sont maturés par addition de CAA en 3. Quant au système de traduction mitochondriale, elle est constituée des ARNr et ARNt codés par l'ADNmt ainsi que d'autres protéines codées par le génome nucléaire, incluant les facteurs de traduction, les protéines ribosomiques mitochondriales MRP et les aminoacyl-tRNA Synthétases (mt-aaRs). Ainsi, L'ADNmt utilise un code génétique différent de celui de l'ADN nucléaire (Ojala, Montoya et al. 1981).

#### **2.4.Réplication de l'ADN mt**

L'ADNmt est reproduit de façon continue, et sa réplication semble se poursuivre indépendamment du noyau. Elle peut se produire dans des cellules en division ou dans des tissus post mitotiques (le cerveau, les muscles squelettiques). Mais, à priori, plusieurs rapports mettant en évidence la relation entre la mitochondrie et le cycle cellulaire, suggèrent une connexion entre l'ADNmt et le cycle cellulaire (Schapira 2006). Le replisome minimal nécessaire à la réplication de l'ADNmt est composé de trois protéines : l'ADN polymérase  $\gamma$  ou POLG, elle synthétise le brin complémentaire au brin parental et elle possède aussi une activité exonucléase 3'-5' et 5' lyase (Kaguni 2004). L'hélicase Twinkle sépare les brins avant le passage de la polymérase dans le sens 5'-3' et les mtSSB (mitochondriale Single Strand Protein) qui se lient à l'ADN simple brin en empêchant son réappariement à son brin homologue.

➤ Deux modèles ont été proposés pour expliquer le mécanisme de la réplication.

Le premier est le mode de réplication non synchronisé « Strand displacement model ». Ce modèle proposé par Clayton et ces collègues (Chang and Clayton 1985), est basé sur des

tests de réplication *in vitro* et des résultats de microscopie électronique. Il suggère que l'initiation de la réplication est unidirectionnelle à partir d'OH dans la région NCR, elle débute par la synthèse du brin H dit précoce à partir d'une amorce ARN synthétisée par l'ARN polymérase MTRPOL. Elle continue le long du brin L pour synthétiser le brin H, et une fois la fourche de réplication atteint OL, la synthèse du brin L commence dans la direction opposée. Pendant le cycle de la réplication, la majeure partie du brin H resterait en forme de simple brin. Ce dernier serait recouvert au fur et à mesure par les protéines mtSSB. A côté de ce modèle, un deuxième nommé RITOLS (Ribonucleotide incorporated throughout the lagging Strand), fut ensuite décrit. Ce modèle, qui repose sur l'observation des intermédiaires double brins de la réplication dont ils sont sensibles à la RNase H, ressemble au modèle synchronisé de Clayton à ceci près que le brin parental H serait recouvert de fragments d'ARN au lieu de protéines SSB (Yasukawa, Reyes et al. 2006).

Le deuxième modèle est dit mode de réplication synchronisé «Strand coupled model ». Proposé par Holt et ces collègues, ce modèle est basé sur une analyse des intermédiaires de la réplication sur des gels bidimensionnels. Il suggère qu'il y a un couplage entre la réplication du brin précoce et le brin tardif, ce qui requiert la présence des fragments d'Okazaki (Fernandez-Silva, Enriquez et al. 2003).

Le mécanisme exact de la réplication est encore débattu. L'opinion actuelle considère qu'il ne serait pas improbable que différents modes de réplication existent et que leur occurrence soit dépendante du type cellulaire. Ainsi, dans les cellules en situation normale, le mode de réplication synchronisé a été suggéré, tandis que le mode de réplication non synchronisé est prédominant dans les cellules en déplétion mitochondriale et requérant une synthèse rapide d'ADN, par exemple en réponse à une baisse de l'ADNmt induite par des agents chimiques comme le BET (Bromide d'éthidium) (Tuppen, Blakely et al. 2010).

## **2.5.Réparation et Maintenance de L'ADNmt**

Les mitochondries possèdent différents systèmes de réparation de l'ADNmt similaires à ceux de l'ADN nucléaire (Larsen, Rasmussen et al. 2005). Malgré l'existence de ces systèmes, il a été estimé que le génome mitochondrial avait un taux de mutation environ 10-20 fois supérieur à celui du génome nucléaire. Il est probable que ce niveau de mutation élevé soit dû au fait que l'ADNmt ne contienne pas d'histones et qu'il est sans cesse soumis aux radicaux libres produits à proximité par l'OXPPOS. Les mutations, en s'accumulant

avec l'âge, induiraient une baisse de fonctionnement de cette dernière engendrant une augmentation de la production des ROS. Il n'est pas étonnant qu'un nombre croissant de mutations somatiques dans l'ADN ait été associé ces dernières années à des maladies très répandues comme le cancer, le diabète, ainsi qu'à des maladies liées à l'âge comme le parkinson et l'Alzheimer (Wallace 2005).

## **Chapitre 2**

# **MALADIES MITOCHONDRIALES**

## 1. Introduction

Les maladies mitochondriales forment un groupe croissant d'affections multiformes aux causes génétiques multiples. Cela ne constitue pas une surprise, si l'on considère qu'outre les 37 gènes portés par le génome mitochondrial humain, plus de 1500 gènes nucléaires sont nécessaires au bon fonctionnement mitochondrial. Les mitochondries sont des organites essentiels à la production d'énergie pour les cellules animales. Ainsi, tout dysfonctionnement dans la chaîne respiratoire peut affecter tous les organes et tissus. Néanmoins, les tissus les plus susceptibles sont ceux qui ont le plus besoin d'énergie comme les muscles et le système nerveux, le cœur. Ces dysfonctionnements engendrent généralement des myopathies et des neurodégénérescences. La prévalence exacte de ces maladies est difficile à vérifier. Néanmoins, plusieurs études épidémiologiques l'ont estimée à environ 1/5000, elle fait donc partie des maladies dites «rares» (Wallace 2005, Rustin, Pierre et al. 2007).

Ces maladies ont été décrites pour la première fois au début des années 1960, où le premier dysfonctionnement mitochondrial (la perte du couplage de l'oxydation et la phosphorylation) a été mis en évidence dans un cas où le métabolisme basal est augmenté mais sans qu'il y ait une hyperthyroïdie, c'est le syndrome de Luft (Luft, Ikkos et al. 1962). Ainsi, ce n'est qu'en 1988 qu'une association des maladies mitochondriales et des mutations particulières a été décrite (MITOMAP 2011). Il s'agit d'une mutation ponctuelle mitochondriale qui a été la cause de la Neuropathie Optique de Leber. Depuis, plus de 250 mutations ont été caractérisées. Ainsi, ces mutations peuvent être d'origine soit nucléaire soit mitochondriale (Wallace 1999). Les mutations du génome nucléaire sont transmises selon un mode mendélien, elles peuvent être soit autosomiques dominantes ou récessives, soit liées au chromosome X tandis que les mutations de l'ADNmt sont exclusivement transmises maternellement (Wong 2010).

Les maladies mitochondriales sont cliniquement hétérogènes. Ceci est dû à la variation de la distribution de la mutation dans les tissus, le taux d'hétéroplasmie dans le tissu affecté et le niveau variable du seuil pour l'apparition des syndromes (L'homoplasmie signifie que toutes les copies de l'ADNmt sont identiques et l'hétéroplasmie est la situation dans laquelle plusieurs types d'ADNmt coexistent. Certaines mutations affectent toutes les copies du génome). Bien qu'il existe des syndromes qui ont été reconnus, dans la plupart



des cas le diagnostic est rendu difficile, car les mêmes mutations dans les mêmes gènes donnent lieu à de différents phénotypes cliniques ou bien différentes mutations ou différents gènes peuvent donner les mêmes symptômes. A titre d'exemple, la mutation la plus commune dans l'ADNmt est m.3243A>G, peut causer le syndrome MELAS ou un Diabète, une surdité et une rétinopathie. La surdité et l'ophtalmoplégie progressive externe peuvent être causées par une délétion de l'ADNmt ou de multiples délétions de l'ADNmt en plus des mutations dans des gènes nucléaires comme *POLG*, *OPA1* et *TWINKLE* (Wong 2010).

Les fonctions mitochondriales sont sous le double contrôle du génome nucléaire et mitochondrial, ainsi, les maladies mitochondriales peuvent être divisées en deux types: d'une part les maladies dues à des mutations dans l'ADNmt et d'autre part les maladies dues au génome nucléaire (Wong 2010).

## **2. Les maladies mitochondriales liées aux mutations de l'ADNmt**

Depuis la découverte de la première mutation dans l'ADNmt jusqu'à présent, plusieurs mutations associées à différentes maladies ont été identifiées. Toutefois, les mutations dans l'ADNmt engendrent plus de 80% de ces maladies. L'apparition des symptômes et la variabilité phénotypiques (mutations dans le même gène peuvent donner plusieurs phénotypes) et le mode de transmission de cet ADNmt sont régis par certaines caractéristiques dont la description aide à mieux comprendre les maladies mitochondriales (Moslemi and Darin 2007, DIMAURO and DAVIDZON.2005).

### **2.1.Caractéristiques générales**

#### **2.1.1. Homoplasmie et hétéroplasmie**

Plusieurs centaines de copies d'ADNmt sont présentes dans la cellule. Certaines mutations affectent toutes les copies du génome, ce sont les mutations homoplasmiques, tandis que les mutations hétéroplasmiques sont les plus répandues, dans plus 90 % des cas (Taylor and Turnbull 2005). Ainsi, l'expression clinique des mutations pathogéniques de l'ADNmt est déterminée par la proportion relative de l'ADNmt sauvage et muté dans différents tissus. En effet, il y a un nombre minimum critique de l'ADNmt muté requis pour engendrer un dysfonctionnement mitochondriale dans un organe ou un tissu donné, ce qui engendre l'apparition des maladies mitochondriales (effet de seuil ou 'threshold effect') (DiMauro

2004). Ce seuil est variable pour chaque mutation et il est tissu spécifique. Il est faible dans les tissus demandeurs d'énergie par rapport à d'autres tissus qui peuvent prendre le relais en anaérobiose. Ce seuil est compris entre 60%-90% de l'ADNmt muté par rapport à l'ADN sauvage (Tuppen, Blakely et al. 2010). Cependant, toutes les mutations pathogéniques hétéroplasmiques de l'ADNmt à l'exception d'une (Sacconi, Salviati et al. 2008, Schon, DiMauro et al. 2010) sont récessives, car il faut un niveau de seuil important (70-80%) pour engendrer les maladies. Cependant, une petite augmentation de la proportion de l'ADNmt serait suffisante pour sauver le fonctionnement normal des mitochondries (Schon, DiMauro et al. 2010)

### **2.1.2. Ségrégation mitotique de l'ADNmt**

Pendant la division cellulaire, les mitochondries sont réparties au hasard, et dans les cellules hétéroplasmiques, la proportion de l'ADNmt dans les cellules filles peut changer. Si le niveau du seuil est atteint pour un tissu particulier, l'expression clinique des maladies peut apparaître. D'autre part, l'ADNmt mutant peut être perdu et plus particulièrement dans les tissus à division rapide (Tuppen, Blakely et al. 2010). Ce phénomène peut expliquer pourquoi certains patients avec des mutations dans l'ADNmt peuvent actuellement manifester différentes maladies mitochondriales pendant différents stades de leur vie (DiMauro 2004).

### **2.1.3. Hérité maternelle de l'ADNmt**

Pendant la fertilisation, tous les ADNmt dérivent de l'ovocyte. Par conséquent, le mode de transmission de l'ADNmt et des mutations ponctuelles de l'ADNmt (les délétions simple de l'ADNmt sont souvent des événements spontanés) est différent de la transmission mendélienne. Une mère portant une mutation ponctuelle va la transmettre à ses descendants (mâles comme femelles). Mais uniquement les filles peuvent la retransmettre (DiMauro 2004).

## **2.2.Types de Mutation**

### **2.2.1. Les mutations ponctuelles de l'ADNmt**

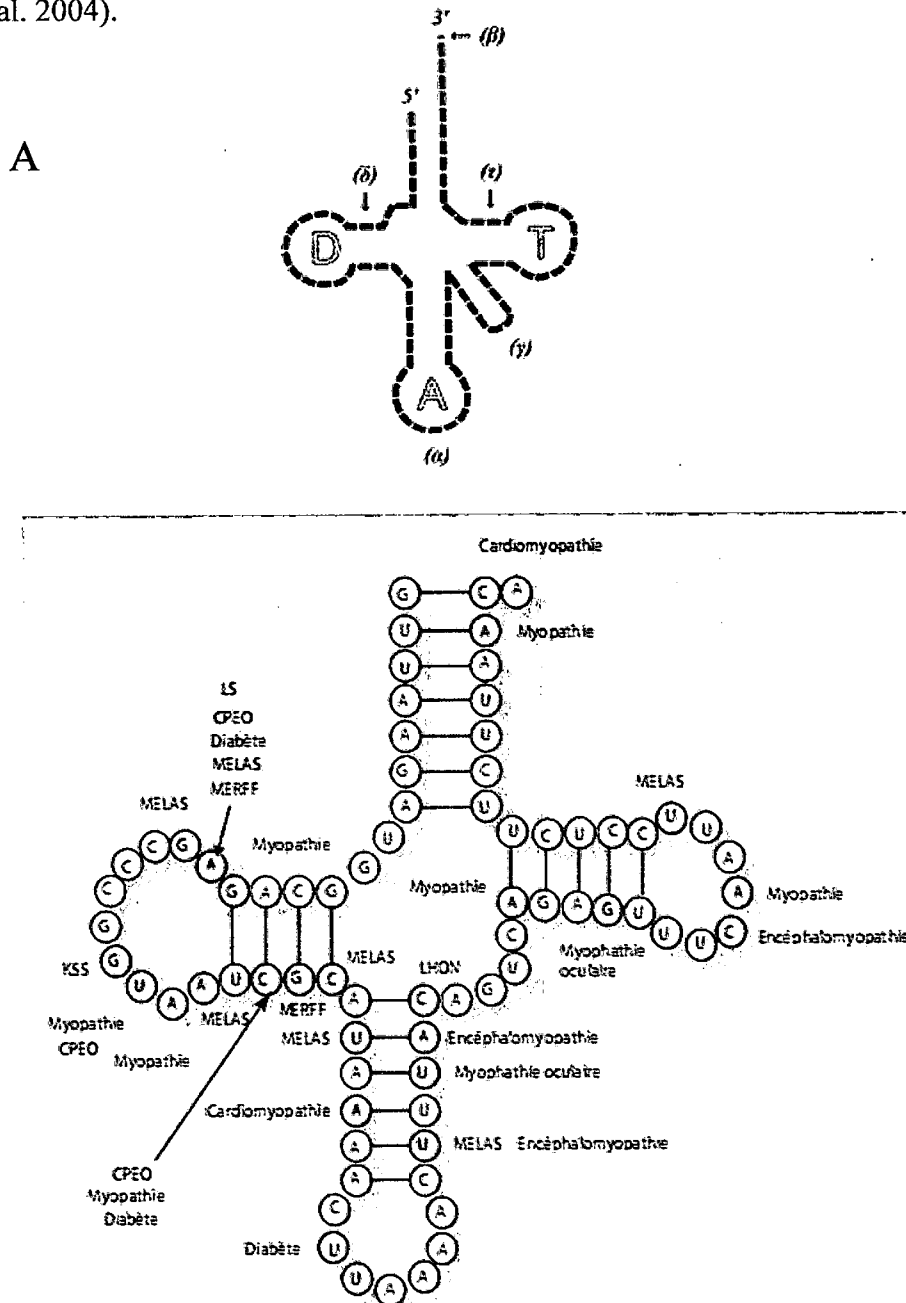
Les mutations ponctuelles de l'ADNmt touchent les gènes codant des protéines, des ARNt et des ARNr. Toutefois, plus que la moitié des maladies associées à ce type de mutations affectent les mt-ARNt. Phénotypiquement, les mutations ponctuelles dans les gènes codant pour des protéines affectent le complexe de la chaîne respiratoire auquel appartient cette

protéine, tandis que les mutations dans les ARNt atteignent l'ensemble de la traduction mitochondriale en affectant la quantité d'ARNt fonctionnelle disponible. Ces mutations sont hétéroplasmiques dans la plupart des cas, cliniquement hétérogènes et hautement récessives. Toutefois, plusieurs cas de mutations pathogéniques homoplasmiqes affectant un tissu unique est caractérisé par une pénétrance incomplète (des individus de génotype identique n'exprimeront pas tous le même phénotype) ont été reconnues. Etant donné que le taux élevé des mutations de l'ADNmt (Tuppen, Blakely et al. 2010).

Un des syndromes les plus répandus est le MELAS. Qui est une Encéphalopathie avec acidose lactique et accidents vasculaires cérébraux. Il a été décrit pour la première fois par Pavlakis et ces collègues en 1984 (Pavlakis, Phillips et al. 1984). Le tableau clinique de ce syndrome inclut des accidents vasculaires cérébraux, myopathie, ataxie, contractions brusques des muscles (myoclonie), démence et surdité. A ces symptômes sont associés à un moindre degré : vomissements, migraines, diabète, ophtalmoplégie, des paupières tombantes (ptosis), une faiblesse musculaire et une petite taille. Ce syndrome, à transmission maternelle, est généralement associé à une substitution de l'Adénine en Guanine **A3243G** dans le gène codant pour l'ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> (Goto, Nonaka et al. 1990). Il peut également être associé à des mutations dans d'autres gènes codant pour des ARNt mitochondriaux. Par ailleurs, cette mutation est entre autre associée à des phénotypes cliniques incluant la CPEO (Ophtalmoplégie externe progressive chronique) et DMDF (diabète sucré et une surdité) (MITOMAP 2011).

Dans la plupart des cas décrits, la mutation m.3243A>G est hétéroplasmique, mais le seuil pathogénique est relatif à chaque individu et varie énormément selon le tissu étudié (Shanske, Pancrudo et al. 2004). Cette mutation survient dans la position 14 de la structure consensus de l'ARNt<sup>Leu</sup>. Ce résidu est très conservé et impliqué dans la structure tertiaire des ARNt (Goddard 1978). Ce résidu joue non seulement un rôle structural mais il est aussi impliqué dans l'interaction avec la leucyl-ARNt-Synthétase (Sohm, Frugier et al. 2003). En plus, la mutation MELAS bloque plusieurs modifications post-transcriptionnelles, telles que méthylation et la modification taurine. Cette dernière concerne la base U (5-taurinemethyluridine) dans la position wobble de l'anticodon de l'ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> mitochondrial. En effet, il a été démontré que la mutation m.3243A>G engendre une réduction de cette modification de l'ordre de 50% soit dans les cellules cybrides MELAS, soit dans les cellules primaires de patients (Helm, Florentz et al. 1999, Yasukawa, Suzuki et al.

2000, Kirino, Yasukawa et al. 2004, Yasukawa, Kirino et al. 2005). La modification de cette base est importante pour la spécificité et l'efficacité de la reconnaissance des codons par l'ARNt<sup>Leu</sup>. Par ailleurs, tout défaut de modification de l'uridine wobble de l'ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> joue un rôle important dans le mécanisme pathogénique du syndrome MELAS (Kirino, Yasukawa et al. 2004).



**Figure3: l'ARNt et les mutations pathologiques.** A. Structure en feuille de trèfle de l'ARNt.α, anti-codon (3 nucléotides) ; β, site de fixation de l'acide aminé ; γ, boucle variable ; δ, branche D ; τ, Branche T ; A, Boucle de l'anticodon ; D, Boucle D ; T, Boucle T Mutations pathologiques de l'ARNt Leucine (UUR). B La localisation des mutations dans la structure secondaire de l'ARNt est représentée en orange (Wittenhagen and Kelley 2003) et al., 2003) revue dans (Comte 2010). CPEO: ophtalmoplégie progressive externe, KSS: Syndrome de Kern Sayre, LS: Syndrome de Leigh LHON: Neuropathy de Leber.

Parmi les conséquences de la mutation m.3243A>G, une diminution de l'aminocyclation de l'ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> dont elle a été démontrée indépendamment par plusieurs groupes de recherches sur différentes lignées cellulaires. Un groupe de chercheurs a montré que l'ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> mutant des cellules cybrides MELAS du carcinome de poumon est exclusivement déacylé ((Meziane, Lehtinen et al. 1998). D'autres chercheurs ont observé une diminution de l'aminocyclation de 70-75% de l'ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> chez les cellules cybrides d'ostéosarcome presque homoplasmiques pour la mutation M.3243A>G, et une diminution aussi de la synthèse protéique (Meziane, Lehtinen et al. 1998, Börner, Zeviani et al. 2000, Chomyn, Enriquez et al. 2000, Park, Davidson et al. 2003). L'analyse des muscles biopsies des cellules MELAS de patients a révélé une diminution de l'aminocyclation de et la quantité l'ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> d'environ 4 fois ((Börner, Zeviani et al. 2000). Cependant, d'autres biopsies n'ont pas montré le même constat. Dans certains échantillons l'expression est aussi efficace que celles des biopsies sauvages. Dans d'autres cas l'expression des ARNt<sup>Leu</sup> est affectée tandis que l'aminocyclation est la même (Börner, Zeviani et al. 2000).

Les conséquences de la mutation MELAS m.3243> G sur la traduction mitochondriale sont variables. Les cellules dont le taux d'hétéroplasmie est >90% se caractérisent par une diminution sévère des la synthèse protéique (Chomyn, Martinuzzi et al. 1992, King, Koga et al. 1992). Les protéines qui sont particulièrement affectées sont ND2, COXI, II et III tandis que d'autres telles que ND4L, ATPase8 et ND6 ne le sont pas. Le pattern qualitatif de la traduction mitochondriale est identique à celle des cellules sauvages. L'analyse de lignées cellulaires MELAS M.3243A>G B-lymphoblastoïdes dont le taux d'hétéroplasmie est > 70% n'a montré aucune diminution significative de la synthèse protéique (Flierl, Reichmann et al. 1997). D'autres part, une diminution de l'incorporation spécifique de la leucine a été observée dans plusieurs polypeptides (ND3 et ND6). Ainsi, l'analyse de différents protéines par empreinte génétique a montré plusieurs produits intermédiaires de la traduction de ND5, COXI et ND4 et une altération de la séquence peptidique. D'autres études sur des cellules de myoblaste de patients atteint du syndrome MELAS ont montré que la synthèse protéique est diminuée de 70% par rapport au contrôle. Ainsi plusieurs profils de migration de protéines ont été détectés D'autre analyse par Endoprotéinase ont mis en évidence une misincorporation d'acides aminés dans trois polypeptides: COXIII, COXII et ATP6, une absence quasi totale de l'assemblage des complexes I, IV et V (Sasarman, Antonicka et al. 2008).

Les analyses de l'expression génique des muscles squelettique des patients atteints du syndrome MELAS ont révélé une différence significative des profils d'expression de 128 transcrits sur un total de 7084 analysés (van Eijdsen, Eijssen et al. 2008). Les mêmes auteurs ont montré une augmentation de l'expression des enzymes produisant des ROS dans les muscles de ces patients ainsi qu'une grande quantité de protéines endommagées. Une différence significative dans l'expression des gènes a été observée entre les porteurs asymptomatiques et symptomatiques de la mutation m.3243A> G. Les auteurs ont suggéré que les protéines non fonctionnelles sont remplacées chez les porteurs asymptomatiques tandis que chez les porteurs symptomatiques, les protéines endommagées ne sont pas réparées ou éliminées. Ce qui entraîne la pathologie musculaire (van Eijdsen, Eijssen et al. 2008).

### **2.2.2. Les remaniements de l'ADN mt**

La majorité des remaniements de l'ADNmt sont des délétions à grande échelle. Elles sont de taille variable comprise entre 1,3-8kb et affectent plusieurs gènes. Les délétions simples de l'ADNmt peuvent se produire sporadiquement tôt au début du développement. Ainsi, la même délétion est présente dans tous les tissus affectés. L'occurrence de multiples délétions de taille variable au niveau des tissus affectés, peuvent être le résultat de mutations des gènes nucléaires codant des facteurs impliqués dans la réplication et la maintenance de l'ADNmt en plus de la régulation du pool mitochondrial des nucléotides. L'accumulation des délétions a été reportée dans des tissus post-mitotiques et chez des patients âgés atteints de maladies neurodégénératives. Quelque soit leur nature, les délétions ont des points en commun. La plupart des délétions auraient lieu entre les deux origines de réplication  $O_H$  et  $O_L$  et elles sont flanquées par des courtes séquences répétées. Ainsi, leur mécanisme de formation est identique malgré qu'il soit toujours débattu. Néanmoins, deux mécanismes ont été proposés pour expliquer ce phénomène. Le premier, partagé par la majorité des chercheurs, stipule que la réplication est le mécanisme susceptible d'engendrer ces délétions. Quant au deuxième mécanisme proposé par Krishnan et ses collègues, suppose que les délétions sont le résultat des erreurs commises par le système de réparation de l'ADNmt (Krishnan, Reeve et al. 2008). Il est important de savoir que les symptômes cliniques sont dus à la quantité et la distribution tissulaire de l'ADNmt délété et non pas à la taille et à la localisation de délétion dans l'ADNmt (Wong 2010).

## **Chapitre 3**

# **THERAPIE GENIQUE DES MALADIES MITOCHONDRIALES**

## 1. Introduction

Différentes thérapies biochimiques ont été utilisées pour traiter les maladies mitochondriales. Mais ces stratégies n'ont pas pu pallier ces désordres d'une manière efficace et durable. La thérapie génique semble offrir un espoir pour traiter les mutations pathogéniques de l'ADNmt (Taylor, Chinnery et al. 1997). Une des voies possibles est la manipulation directe de l'ADNmt qui a pour but la modification du taux d'hétéroplasmie dans les mitochondries, comme la majorité des mutations pathogéniques sont hétéroplasmiques. L'objectif est donc de diminuer le nombre de copies de l'ADNmt muté, soit par l'adressage des agents qui peuvent inhiber sélectivement la réplication de l'ADNmt muté soit par l'adressage des enzymes de restriction qui sont capables de reconnaître un site unique introduit par la mutation et de couper l'ADNmt muté (Wallace 2005). L'autre type d'approche est l'expression allotopique. Elle signifie l'expression d'un gène dans un compartiment cellulaire alternatif pour le rediriger vers sa localisation initiale. Le but de cette approche est d'essayer d'utiliser la voie d'import des protéines et les acides nucléiques à des fins thérapeutiques. Le concept de cette approche consiste à identifier le gène mitochondrial muté. Ensuite, introduire une copie sauvage dans le noyau, et enfin, importer des produits de ce gène du cytosol dans la mitochondrie (Turnbull and Lightowers 2002, Smith, Ross et al. 2004).

## 2. Approche anti-génomique

Cette approche a été proposée par Taylor et ses collègues en 1997. Elle est basée sur l'utilisation des molécules qui peuvent inhiber sélectivement la réplication de l'ADNmt muté, ceci permettant la propagation de l'ADNmt sauvage. Pour valider cette idée, cette équipe a conçu des PNA «peptide nucleic acids» analogues d'ADN portant une unité aminoéthyle, qui remplace le désoxyribose phosphate, liée aux bases par un lien méthyle carbonyle. Ces molécules sont capables de former un duplex avec l'ADN simple brin, plus stable que le duplex ADN:ADN. Les auteurs ont désigné les oligonucléotides PNA complémentaires à une région de l'ADNmt qui contenait une délétion de 4977 bases. L'utilisation de la réplication *run-off* *in vitro* a permis aux chercheurs de constater que les PNA s'hybrident spécifiquement avec l'ADNmt simple brin muté, inhibant la réplication à 80% de l'ADNmt muté sans affecter la réplication de l'ADNmt sauvage. De la même façon, les auteurs ont construit un autre PNA complémentaire à la région qui contient la substitution A8344G, qui cause le syndrome MERRF. Cet agent permettait d'inhiber 75% l'ADNmt muté (Taylor,



Chinnery et al. 1997). Par la suite, cette méthode a été appliquée sur des cellules humaines en culture. Pour résoudre le problème d'import dans les mitochondries, ces chercheurs ont construit deux molécules de PNA : une conjuguée avec une pré-séquence protéique et l'autre avec un cation lipophile leur permettant l'adressage vers les membranes mitochondriales. L'adressage des PNA vers les mitochondries a été observé. Par contre ces molécules n'ont pas pu réduire la propagation de l'ADNmt muté *in vivo* (Turnbull and Lightowers 2002, Smith, Ross et al. 2004).

Une autre approche a été testée. Elle concerne l'utilisation des enzymes de restriction pour changer le taux d'hétéroplasmie. Certaines mutations mitochondriales peuvent créer un site pour une enzyme de restriction donnée. L'adressage de cette enzyme dans des mitochondries de cellules en culture a permis d'éliminer l'ADNmt muté. Récemment, Bayona et ses collègues ont pu développer un système qui permet de diminuer spécifiquement l'ADNmt muté, portant une mutation **T8399G** dans le gène codant ATPase6, qui introduit un site de restriction pour *Apal1*. (Turnbull and Lightowers 2002). Pour cela, les auteurs ont utilisé des souris comme modèles d'études. La transfection transitoire a permis de colocaliser l'enzyme dans les mitochondries des cellules hépatiques. Après une transfection stable d'une construction *Apal1* ayant un promoteur inductible dans les hépatocytes, l'expression d'*Apal1* (tagué avec l'hémagglutinine) et l'adressage dans les mitochondries a été démontré. Cet adressage est accompagné d'une augmentation l'ADNmt sauvage. Ensuite, les auteurs ont testé l'efficacité de cette approche sur des tissus nerveux et musculaire. Suite à la transfection par l'enzyme *Apal1* recombinante, une augmentation de l'hétéroplasmie dans les muscles et le cerveau a été observée (Bayona-Bafaluy, Blits et al. 2005).

### **3. Expression allotopique des protéines codées par l'ADN mt**

Cette approche a pour objectif d'exprimer allotopiquement des versions sauvages des protéines de l'OXPPOS défectueuses, codées par l'ADNmt, avec une séquence d'adressage mitochondriale dans le noyau. Puis, elles sont readressées dans la mitochondrie pour compléter la mutation. Plusieurs problèmes sont à prendre en considération. Admettant que c'est possible qu'une protéine codée par l'ADNmt peut être importée dans la matrice mitochondriale après avoir été transcrite dans le noyau et traduite dans le cytosol, comment se fera l'assemblage dans l'OXPPOS ? En effet, il serait possible que cette protéine doive entrer en compétition avec les protéines endogènes mutées. L'autre problème concerne les

différences des codes génétiques mitochondriales et universelles. Nagley et ces collègues en 1988 ont réussi à surmonter ces difficultés en utilisant la levure comme modèle. Ils ont fusionné le gène mitochondrial l'ATPase8 de *Saccharomyces cerevisiae* recodé pour expression nucléaire avec la partie N-terminale du gène d'ATPase9 du champignon *Neurospora crassa* qui code pour le peptide signal. La construction a été ensuite exprimée dans *Saccharomyces cerevisiae* déficiente en ATPase8. La protéine allotopiquement exprimée était adressée dans la mitochondrie et intégrait le complexe d'ATP synthase. Les auteurs ont observé la restauration de la production d'ATP et de la respiration dans la souche mutée (Smith, Ross et al. 2004).

La même idée a été reprise par Manfredi et ces collègues en 2002, mais sur des cellules cybrides humaines. D'abord, les auteurs ont essayé de trouver les conditions optimales pour pallier les difficultés décrites ci-dessus. Pour ce faire, ils ont utilisé la mutagenèse dirigée pour recoder les 11 codons non universels de *MTATP6* «l'ATPase6 mitochondriale» fusionnés avec la séquence d'adressage du cytochrome c oxydase8 (*COX8*). Puis ils ont réussi à démontrer l'expression de ce gène sauvage chimérique dans une cellule humaine et co-localiser par immunohistochimie la protéine recombinante avec la sous unité 2 du cytochrome c oxydase (*cox2*). L'utilisation du Western blotting a révélé l'assemblage de *MTATP6* mature avec le complexe ATP synthase. Ensuite, cette construction a été utilisée pour transfecter des cellules cybrides homoplasmiques (100% ADNmt muté) portant la version mutée *MTATP6* sur l'ADNmt. La protéine recombinante était adressée dans la mitochondrie et assemblée dans le complexe V de la chaîne respiratoire. Les auteurs ont constaté une légère augmentation de la production d'ATP, mais la respiration n'était pas restaurée. Cet effet c'est avéré non seulement partiel, mais également temporaire (Manfredi, Fu et al. 2002).

#### **4. Import d'ARN dans les mitochondries et thérapie génique**

Il existe une voie naturelle d'importation des ARN codés par l'ADNn qui pourrait être utilisée à des fins thérapeutiques. L'importation mitochondriale des ARN a été démontrée chez les plantes, les protozoaires, les champignons et animaux. Le nombre et le type d'ARN importés varient d'un système à l'autre. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* deux ARNt sont importés (le laboratoire d'accueil a mis en œuvre l'import de l'ARNt<sup>Lys</sup> (Martin, Schneller et al. 1979) et récemment l'import de l'ARNt<sup>Gln</sup> a été démontré (Rinehart, Krett et

al. 2005). Chez les plantes, plusieurs le sont. Chez des protozoaires de différentes espèces le nombre d'ARNt importé varie entre la moitié et la quasi-totalité du pool mitochondrial. Enfin, chez les trypanosomes, tous les ARNt mitochondriaux ont une origine nucléaire. Dans les cellules humaines il n'y a pas d'ARNt importé, mais par contre, trois autres types d'ARN de petite taille sont adressés dans l'organite: les ARN composants de la RNase P et de nucléase MRP ainsi que l'ARN ribosomal 5S (Kolesnikova, Entelis et al. 2004).

L'équipe de Tarassov (laboratoire d'accueil) a pu déterminer la plupart des facteurs clés de l'importation de l'ARNt<sup>lys</sup> chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cette équipe a montré aussi que l'ARNt importé peut participer à la traduction mitochondriale. La capacité de cet ARNt<sup>lys</sup> importé et ses dérivés artificiels à compléter une mutation dans l'ADNmt de la levure, ont été testés *in vitro* et *in vivo*. Les auteurs ont utilisé un ARNt<sup>lys</sup> muté qui peut décoder un codon stop UAG. L'ARNt utilisé était capable de compléter une mutation introduite artificiellement dans le gène codant la sous unité 2 du *cytochrome c oxydase* mitochondriale (Kolesnikova, Entelis et al. 2000). Ensuite, les auteurs ont démontré que l'import des ARNt peut être établi artificiellement dans les mitochondries humaines isolées. Les auteurs ont voulu tester si l'import des ARNt dérivés de l'ARNt<sup>Lys</sup> permet le rétablissement des fonctions respiratoires dues au syndrome de MERRF. Une transfection des cellules cybrides a été réalisée et l'expression des gènes a été détectée dans le cytosol des cellules par Northern blotting. Ensuite, ces ARNt ont été localisés dans la matrice des mitochondries purifiées. L'analyse cytochimique de l'activité du cytochrome c oxydase (complexe IV) a révélé une augmentation de 60-70% de cellules COX positives dans les cellules transfectées. L'analyse des clones individuels transfectants ARNt a permis d'observer une corrélation entre la quantité d'ARNt importée et l'augmentation du taux de la respiration, de la restauration du potentiel membranaire, du rétablissement partiel des activités enzymatiques du complexe I et IV. Ceci suggère que le rétablissement du métabolisme oxydatif est dû à l'import des ARNt. L'analyse de l'activité traductionnelle de ces ARNt a montré qu'ils peuvent participer à la traduction et que ces ARNt sont correctement aminoacylés. Pour vérifier que la complémentation de la mutation est effectivement due à l'import de ces ARN, les auteurs ont étudié l'effet des siRNA complémentaires aux ARNt<sup>Lys</sup> recombinants. En effet, la transfection transitoire des cybrides qui expriment les ARNt<sup>Lys</sup> par ces siRNA menait à une extinction des transcrits de ces ARNt et en même temps une réapparition des symptômes de la mutation. Les auteurs ont conclu que la complémentation de la mutation est due à l'import

des dérivés d'ARNt de levures. Pour valider le modèle sur des cellules proches de la situation réelle, Tarassov et ces collègues ont utilisé des fibroblastes primaires humaines, portant eux aussi la même mutation. Il a été montré que les mêmes ANRt<sup>Lys</sup> sont exprimés et partiellement importés dans les mitochondries. L'import de ces ARNt coïncidait avec une atténuation des symptômes de cette mutation (Kolesnikova, Entelis et al. 2004).

## 5. Objectif du stage de Magistère

Mon travail au laboratoire du Dr Tarassov s'inscrit dans un projet de recherche visant à exploiter la voie d'import des acides nucléiques à des fins thérapeutiques. Après avoir mis en évidence l'existence d'une voie naturelle et artificielle d'import d'ARNt<sup>Lys</sup>, celle-ci a été exploitée pour faire entrer dans les mitochondries humaines des ARNt recombinants capables de compléter une mutation pathogénique de l'ARNt<sup>Lys</sup>mt. Cette approche a donné des résultats encourageants (Kolesnikova, Entelis et al. 2004). Le Dr Tarassov et ses collègues ont alors voulu expérimenter la même idée appliquée à une autre mutation affectant le gène codant pour l'ARNt<sup>Leu</sup>, qui engendre le syndrome de MELAS.

Afin de réaliser ce projet, il est nécessaire de s'affranchir de plusieurs obstacles. Tout d'abord le fait que ces ARN ne sont pas importés d'une manière naturelle dans les mitochondries a compliqué la tâche. En effet, plusieurs expériences de mutagénèses dirigées *in vitro* ont été réalisées sur les ARNt<sup>Lys</sup> afin de les rendre importables dans les mitochondries humaines et aminoacylables par la Leucyl ARNt Synthéase. Ainsi, l'effet des ces ARNt recombinants a lui aussi été testé. Après avoir réalisé ces expériences délicates avec succès, il semblait évident de tester ces ARNt recombinants *in vivo* sur des cellules cybrides MELAS. Il était important de sélectionner un modèle de cellules approprié afin d'étudier les différentes fonctions mitochondriales. Les cellules cybrides ont depuis longtemps été utilisées pour étudier les maladies engendrées par des mutations de l'ADNmt. Elles sont obtenues par fusion des cellules rho0 (des cellules cancéreuses d'ostéosarcomes ou des cellules Hela) dépourvues de leur ADNmt et des cytoplastes de patients (dépourvues de leur noyau et contenant l'ADNmt muté) (King and Attardi 1989).

Afin d'examiner le potentiel thérapeutique des ARN recombinants sur les fonctions mitochondriales, nous avons utilisé des cellules cybrides MELAS m.3243A>G mutées dans

le gène codant pour l'ARNt<sup>Leu</sup> le taux d'hétéroplasmie étant  $90\pm 5\%$ . Les propriétés de ces cellules varient selon la lignée étudiée. Ainsi, pour mieux caractériser la lignée modèle, nous avons réalisé plusieurs analyses qui concernent l'activité enzymatique des complexes de la chaîne respiratoire affectés et des tests de la respiration mitochondriale.

A ce stade du projet, il s'agissait pour moi de comparer les protéines affectées par la mutation entre des lignées de cellules mutantes et sauvages, l'activité enzymatique des complexes I et IV, ainsi que la respiration cellulaire.

## **Deuxième Partie**

# **EXPERIMENTATION**

# **Chapitre 1**

## **MATÉRIELS et METHODES**

## 1. Techniques de Culture cellulaire

### 1.1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires utilisées durant mon stage sont des cellules cybrides obtenues par fusion des cellules *rho*<sup>0</sup> dérivées d'ostéosarcomes 143B.TK avec des cytoplastes de fibroblastes primaires d'un patient ayant une mutation ponctuelle (la mutation MELAS A2343G dans l'ADNmt) dans la région codant pour ARNt<sup>Leu(UUR)</sup>. Ces cellules ont été fournies gracieusement par le Dr. E.A. Shoubridge (Institut Neurologique de Montréal, Québec, Canada). Le taux d'hétéroplasmie de cette mutation dans ces cellules cybrides est de 90±5%.

Le milieu de culture utilisé pour cultiver les cellules cybrides est le **DMEM** (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) contenant 4,5 g/l de glucose, 110 mg/ml de Pyruvate de Sodium et (2mM) L-Glutamine de *Sigma*. Ce milieu est supplémenté avec du Sérum foetal de veau 10% (w/v) décomplémenté à 55°C pendant 40 minutes, de 10µg/ml d'uridine et de concentration standard d'antibiotiques et d'antifongiques: pénicilline et streptomycine 10mg/ml et Fungizone 250µg/ml. Le bicarbonate de sodium (3,7g/l) est ajouté comme tampon dans le milieu de culture dont le pH est de 7,4.

Les cellules sont cultivées dans des flasques de 25 cm<sup>2</sup>, 75 cm<sup>2</sup>, 175 cm<sup>2</sup> (Plastic Cell+, *Sarstedt*) dans un incubateur à l'intérieur duquel le taux d'humidité atteint 100 %, à une température de 37 °C et un taux de 5 % de CO<sub>2</sub>.

Les cellules stockées à -180°C dans l'azote liquide, elles sont incubées au bain marie à 37 °C pendant 2 min. Un volume de 300 µl de DMEM préchauffé à 37 °C est ensuite ajouté et les cellules réincubées 1 min à 37 °C. L'opération est répétée 2 fois et les cellules sont centrifugées 5 min à 600 g. Le culot est resuspendu dans du milieu DMEM ou DMEM supplémenté avec de la Puromycine (2 µg/ml) et les cellules sont mises en culture.

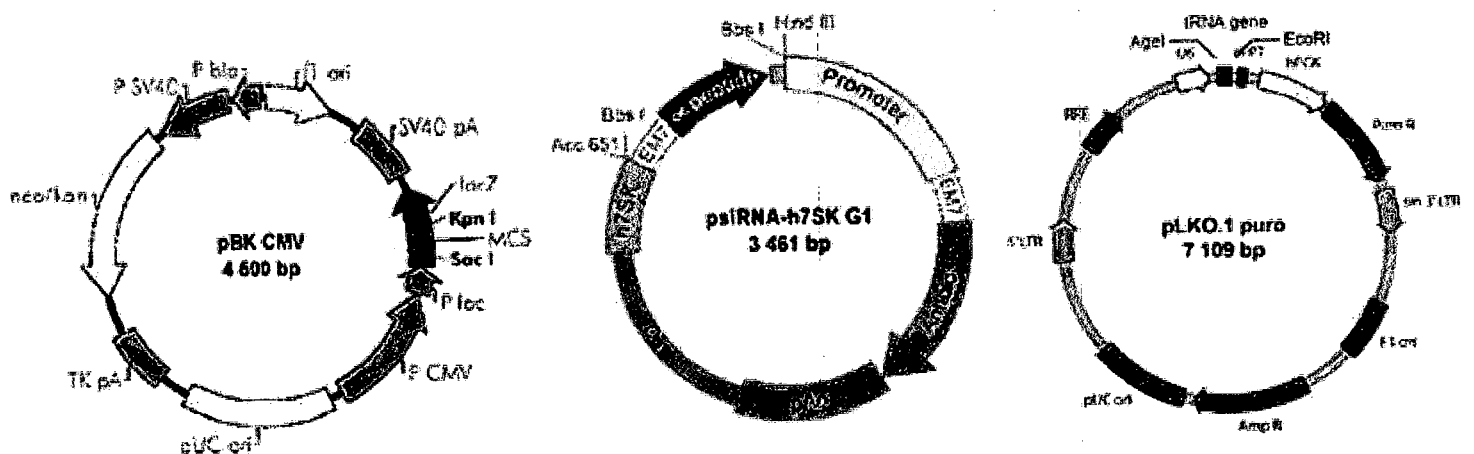
Chaque jour, les cellules sont observées à l'aide d'un microscope inversé. Le milieu de culture est renouvelé tous les deux jours. Une fois les cellules arrivées à confluence, elles sont détachées dans du tampon **PBS-EDTA** 1 mM, puis centrifugées 5 min à 600 g et resuspendues. Ensuite, elles sont mises en cultures ou utilisées pour d'autres expériences. Pour le comptage des cellules, un compteur automatique *Scepter* (*Millipore*) est utilisé. Les cellules sont diluées dans du **PBS** dans un volume supérieur à 50 µl, le nombre de cellules est



estimé selon les instructions du fournisseur (*Millipore*). Pour la congélation, les cellules sont décollées au **PBS-EDTA** et centrifugées 5 min à 600 g. Le culot est resuspendu dans 300 µl de sérum de veau fœtal additionné de 10 % de DMSO. Les cellules sont d'abord stockées 24 h à -80 °C dans une boîte cryo-freezer Block (*Fischer Scientific*) puis à -180 °C dans l'azote liquide. Toutes les cellules en culture (MELAS et 143B) sont testées régulièrement pour l'infection du Mycoplasme. Le test est basé sur une détection par PCR (Dussurget and Roulland-Dussoix 1994)

### 1.2. Transfection des cellules en cultures

La démarche adoptée a été d'introduire dans les cellules en culture les ARNt<sup>LEU</sup> recombinants, et analyser, après transfection, leur adressage dans les mitochondries et leur état d'aminocyclation et ensuite leur effet thérapeutiques. Différentes techniques de transfection ont été réalisées au laboratoire. La première consiste à utiliser un agent de transfection qui est la Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Cet agent a été utilisé avec des transcrits d'ARNt<sup>LEU</sup> recombinants pour une transfection transitoire ou avec des plasmides contenant des gènes codant pour les ARNt recombinants (les plasmides utilisés sont basés sur les vecteurs: pBKE, psiRNA-h7SK, pLKO.1). Par ailleurs, des transfections stable ont été réalisés soit on utilisant de la Lipofectamine 2000 avec les plasmides mentionnés ci-dessus, soit on utilisant les lentivirus pLKO.1. Pour la carte des plasmides voir la figure ci-dessous.



**Figure 4:** Carte de clonage de différents plasmides, pBK CMV (Stratagene): plasmide dérivé de pUC, il contient un promoteur fort du virus de tabac ; psiRNA-h7SK (Invivogen): utilisé pour le RNA silencing, il contient une séquence promotrice de l'ARN polymérase III, pLKO (Adgene): un lentivirus qui est capable de s'introduire tout seul dans les cellules.

## 2. Extraction et analyse NORTHERN-BLOT de l'ARN total

Pour extraire l'ARN des cellules en culture, celles-ci sont détachées avec du tampon PBS-EDTA, centrifugées à 600 g pendant 5 min et le culot lysé dans 1 ml de TRIzol Reagent (*Invitrogen*). Après 5 min d'incubation à température ambiante, 200 µl de chloroforme sont ajoutés. Le milieu est mixé pendant 15 secondes, incubé 3 min à température ambiante et centrifugé 15 min, 12000 g à 4° C. La phase supérieure (aqueuse) est récupérée, mélangée à 500 µl d'isopropanol et précipitée à -20 °C pendant 2 heures. Les ARN sont ensuite centrifugés 30 min à 10000 g, lavés dans l'éthanol 80 % puis 100 %, séchés et repris dans 20 µl d'eau stérile (selon la méthode d'extraction TRIzol d'*Invitrogen*). Ensuite, les ARN sont séparés selon leur taille par migration sur gel de polyacrylamide dénaturant. Le gel (concentration finale 8-15 %) est préparé à partir d'une solution d'acrylamide/N, N'-méthylène bis-acrylamide (19/1) à 40 % dans du TBE 1X et 8M d'urée. La polymérisation du gel s'effectue par l'addition d'APS (0,1 % (p/v)) et du TEMED (0,035 % (v/v)).

Avant le dépôt, les acides nucléiques sont additionnés d'un volume de tampon de charge STOP et chauffés pendant 3 min à 90 °C. La migration s'effectue sous 20 mA dans le tampon TBE 1X. Le bleu de Bromophénol et le xylène cyanol constituent des témoins de migration. Les ARN sont ensuite visualisés sous UV après coloration du gel par le bromure d'éthidium à 1 µg/ml (*Gbox, Syngene*). Le gel est ensuite incubé dans du tampon de transfert puis soumis à un électro-transfert sur membrane *HybondN (GE healthcare)* 6 h à 4 °C, 10 V, 100 mA dans du tampon de transfert ARN. Ces derniers, sont ensuite radio-marqués avec la T4 Polynucléotide Kinase (PNK), qui transfère le groupement  $\gamma$ -phosphate du  $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP sur l'extrémité 5'OH de l'oligonucléotide simple brin. 50 pmoles d'oligonucléotide sont incubés à 37 °C pendant 45 min en présence de 2 µl de tampon 10X (Promega), de 1,5 µl de  $\gamma$ -ATP (10 mCi/ml ; 5000 Ci/mmoles), de 1 U de polynucléotide Kinase (Promega) pour un volume final de 20 µl dans de l'eau stérile. La préparation est ensuite déposée sur une colonne de DEAE-cellulose (DE-52, 1 ml) lavée au préalable avec trois volumes de tampon STE 0,2 M. L'oligonucléotide est élué avec 6 ml de tampon STE 1M. L'éluant est ensuite stocké à -20 °C en présence d'un volume égal de tampon de pré-hybridation (Karicheva, Kolesnikova et al.).

Après le transfert des ARN, la membrane est séchée et fixée sous UV (0,8 J/cm<sup>2</sup>) pendant 3 min dans l'*Ultraviolet Crosslinker (Amersham)* puis incubée à 60 °C dans une solution de pré-hybridation pendant 2 heures. Cette dernière est ensuite remplacée par la solution

d'hybridation. Après 6 heures à 60 °C, la membrane est lavée 3 fois 10 min à température ambiante avec agitation dans un tampon de lavage, scellée et exposée pendant 24 h sur une plaque Imaging plate Fuji BASIII. Les signaux correspondant à la sonde marquée sont révélés par le scanner Typhoon TRIO (*GE Healthcare*). Avant d'être incubée avec une nouvelle sonde, la membrane est des-hybridée par lavage à 80°C dans une solution de dés-hybridation pendant 30 à 45 min (Karicheva, Kolesnikova et al.).

Sonde d'ADN pour détection de ARN<sup>t<sup>Leu</sup></sup> :

Anti-tRK1 (1-34) GAGTCATACGCGCTACCGATTGCGCCAACAAGGC

**Tampon de transfert ARN:** 25mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> / Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> pH 7,4

**Tampon SSC 1X :** 0.15M NaCl; 0.015M Trisodium citrate; NaOH qsp pH7

**Tampon de pré-hybridation :** 6xSSC, solution de Denhardt 10X, 0,2% SDS

**Solution de Denhardt 100x** Ficoll 2% ; Polyvinyl-pyrrolidone 2%, BSA 2%

**Solution d'hybridation :** 1 volume de solution de pré-hybridation, 1 volume de sonde radiomarquée dans NaCl 1M

**Tampon de lavage :** 2xSSC, 0,1% SDS

**Solution de dés-hybridation:** 0,02xSSC, 0,1%SD

### 3. Western Blotting

Les protéines sont extraites des cellules en cultures, celles-ci sont détachées avec du tampon PBS-EDTA, centrifugées à 600 g pendant 5 min et le culot est resuspendu dans PBS 1x, la quantité de protéines est mesurée selon la méthode de Bradford. 1-5µl d'échantillon est prélevée, lysé en présence de 50 µl de NaOH 6 %. Le volume est complété jusqu'à 800 µl d'eau et 200 µl du réactif de Bradford sont ajoutés, mélangé et mesuré à une longueur d'onde λ595. Les échantillons des cellules en suspension dans du PBS1X sont ensuite centrifugés pendant 5 min, 600 xg, les culots resuspendus dans du *Laemmli Sample Buffer* (Laemmli 1970). Les composants du *Laemmli Buffer* ont chacun un rôle important à jouer. Le 2-β-mercaptoéthanol est un agent réducteur, il permet de réduire les ponts Disulfures.

Le SDS est un détergeant, il dénature les protéines en leur conférant une charge négative, donc les protéines vont se séparer uniquement selon leurs tailles. Les échantillons sont ensuite soniqués (afin de casser l'ADN et les membranes cellulaires) avec un sonicateur *VibraCell 72408*, 20 khz (*Bioblock Scientific*), pendant 5 secs à une amplitude de 37 %. Les protéines sont préchauffées à 60 °C pendant 10 min avant d'être déposées sur le gel de polyacrylamide. Les protéines sont concentrées sur un gel de concentration de 4 % d'acrylamide et séparées dans un gel de séparation à 12,5 % d'acrylamide. L'électrophorèse est effectuée dans un tampon Tris-Glycine-SDS (*Euromedex*) et un marqueur de taille EuroMedex Prestained Protein Ladder (170, 130, 100, 70, 55, 40, 35, 25, 15, 10 kDa). La migration s'effectue sous 40 mA, 100 V. Afin de rendre les protéines accessibles à la détection par anticorps, elles sont transférées depuis le gel sur une membrane de nitrocellulose. La membrane est placée face-à-face avec le gel, et un courant électrique est appliqué aux grandes plaques sur l'un des deux côtés. Les protéines chargées migrent depuis le gel vers la membrane en conservant l'organisation relative qu'elles avaient dans le gel. Il résulte de ce transfert que les protéines sont exposées sur une surface mince, ce qui facilite les étapes de détection ultérieures. Tant les membranes de nitrocellulose sont "collantes", liant des protéines de manière non-spécifique (c'est-à-dire qu'elles lient toutes les protéines présentes dans l'échantillon de la même façon). Le gel est récupéré, une fois la migration terminée, et mis dans une cassette de transfert (BioRad) où le gel est collé à la membrane de Nitrocellulose (GE Healthcare), la cassette est ensuite incubée dans du tampon de transfert puis soumise à un électro-transfert pendant 2 h à 4 °C, 100 V, 250 mA.

Après le transfert, la membrane est incubée dans du rouge Ponceau afin de vérifier que le transfert a bien eu lieu, puis lavée avec du *tampon de lavage*, ensuite incubée pendant 2 h à température ambiante en présence du *tampon de lavage* contenant du lait filtré (5 %) pour permettre le blocage des sites de fixation non spécifiques des anticorps. Ensuite la membrane est lavée 5 fois 10 min avec du *tampon de lavage*, puis hybridée avec l'anticorps primaire (préparé dans du *tampon de lavage* contenant de 2 % de BSA, la concentration d'anticorps est de type dépendante) pendant une nuit à 4 °C, suivi d'un lavage de 5 fois 10 min. Ensuite la membrane est hybridée avec l'anticorps secondaire conjugué avec la peroxydase «ECL<sup>TM</sup> horseradish peroxidase conjugated secondary antibody de 'GE Healthcare'» (1: 10000) préparé dans du *tampon de lavage*. L'incubation s'effectue à température ambiante pendant 1 h. Puis la membrane est lavée comme décrit précédemment. Ensuite, les complexes protéines-anticorps formés sur la membrane sont détectés en ajoutant le substrat de révélation

“ECL™ Plus Western Blotting Detection Reagent” (GE Healthcare) spécifique de la peroxydase puis la membrane est scannée par “Typhoon TRIO” (GE Healthcare) et la quantification des bandes s’effectue avec ImageQuantTL un logiciel de quantification du même fournisseur. La détection des complexes protéines-anticorps sur la membrane est basée sur une réaction chimique. En effet, la peroxydase, conjuguée avec l’anticorps secondaire, catalyse l’oxydation du substrat PS-3 Acridine qui génère un produit excité émettant une lumière (émission maximale à une longueur d’onde de 430 nm) capturée et analysée par le Typhoon Trio. D’autre part, la détection par fluorescence est une autre méthode utilisée. Elle est basée sur l’utilisation des anticorps secondaires conjugués à un fluorophore qui, une fois excité, émet un signal fluorescent, scanné par le Typhoon, proportionnel à la quantité d’anticorps fixée sur la membrane et donc la protéine. Nous avons utilisé deux anticorps, l’un est un anticorps de souris conjugué avec la cyanine 3 et l’autre un anticorps de lapin conjugué à la cyanine 5. Chacun d’entre eux possède un spectre d’émission qui lui est propre.

**Laemmli Buffer:** 125mM Tris-HCl (pH 6,8), 20% glycérol, 4% SDS, 10%  $\beta$ -mercaptoethanol, 0,004% bleu de Bromophénol

**Gel de concentration:** 0,375M Tris-HCl (pH 6,8), 0,1% SDS

**Gel de séparation:** 0,125M Tris-HCl (pH8,8), 0,1% SDS

**Tampon de migration:** Tris-Glycine-SDS: 25mM Tris-HCl, 192mM glycine, 0,1% SDS

**Tampon de transfert:** Tris-Glycine-SDS1X, 20% éthanol

**Marqueur de taille :** Prestained Protein Ladder (Fermentas)

**Tampon de lavage** 50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 0.2% Tween 20

**Solution de blocage:** tampon de lavage supplémenté de 5% lait sans acide gras

**Tampon de déshybridation «de stripping»** 100 mM 2-Mercaptoethanol, 2% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.7

**Solution de révélation ECLplus de(GeHealthcare):**

**Solution A :** le substrat ECL plus contenant le tampon Tris-HCl

**Solution B:** solution stocke d’acridane dans la Dioxane et l’éthanol, 2.5 ml

Pour avoir le substrat de détection nous avons utilis, selon les instructions du fournisseur, une proportion SolA/SolB équivalente à une proportion de 40/1. La révélation est réalisée par le Typhoon Trio du même fournisseur.

#### 4. Test de l'activité enzymatique des complexes I et IV

Le test est réalisé en utilisant un kit de détection Microplaque (*Mitosciences*) afin de déterminer l'activité de ces deux complexes de la chaîne respiratoire. Ces microplaques contenaient des anticorps monoclonaux adsorbés en surface des puits. Lorsque l'enzyme est immuno-capturée, son activité est déterminée en suivant l'absorbance qui est proportionnelle à l'activité enzymatique.

La méthode se déroule en 4 étapes. Selon les instructions du fournisseur, la première et la deuxième consistent à préparer les échantillons et les incubés. En effet, les cellules sont récupérées des flasques arrivant à confluences, leur nombre est estimé, et la concentration protéique déterminée (la concentration optimale est de 5 mg/ml correspondant à  $10 \times 10^6$  cellules), puis une extraction protéique est réalisée en ajoutant le détergent. (1/10ème du volume total: par exemple, si le volume de l'échantillon est de 500  $\mu$ l, le volume du détergent ajouté est de 50  $\mu$ l).

Après avoir mixé l'échantillon, les tubes sont mis dans la glace pendant 30 min afin de permettre la solubilisation, puis centrifugés pendant 20 min, 13000 rpm, à 4 °C. Le surnageant est récupéré, dilué dans la solution d'incubation selon l'intervalle de concentration de chaque type cellulaire indiqué dans le protocole du fournisseur. Dans notre cas, la concentration est de 1  $\mu$ g/ $\mu$ l. Ainsi, 200  $\mu$ l d'échantillons sont déposés par puits, puis la microplaque est incubée à température ambiante pendant 3 heures.

La troisième étape consiste à mesurer l'absorbance des échantillons. A la fin de l'incubation, les puits sont vidés en les tournants à l'envers, 300  $\mu$ l du tampon «Buffer» de lavage sont ajoutés, puis ôtés puis rincés une deuxième fois de la même façon. 200  $\mu$ l de «Assay Solution» sont délicatement ajoutés afin d'éviter la formation de bulles d'air, qui sont éliminées le plus rapidement possible. Puis l'absorbance est mesurée à température ambiante pendant 30 minutes à une absorbance de 450 nm pour le complexe I et 550 nm pour le complexe IV, avec un intervalle de 20 sec – 1 min entre ces mesures.

## 5. Mesure de la consommation d'oxygène (respiration cellulaire)

La consommation d'oxygène a été mesurée en utilisant l'électrode de Clark de *Hansatech Instruments*. Le principe de mesure est basé sur la transformation du courant électrique généré par la diffusion de l'oxygène à travers la membrane en une tension proportionnelle à la concentration d'oxygène dans la solution. Une fois la calibration du courant réalisée avec une concentration connue d'oxygène, nous pouvons mesurer la consommation d'oxygène soit en présence de mitochondries isolées soit des cellules entières.

Pour mesurer la consommation d'O<sub>2</sub> du complexe I, les cellules arrivant à confluences dans les flasques sont détachées avec du PBS-EDTA 1 mM, centrifugées et reprises dans du PBS. Leur nombre est calculé en utilisant le *scepter*. Ensuite, ces cellules sont resuspendues dans le tampon de respiration. D'autres part, l'électrode est lavée avec de l'éthanol 70 %, rincée trois fois avec l'eau distillée, puis, remplie avec 1ml du milieu de respiration. Ainsi, la chambre à oxygène est équilibrée avec l'air ambiant. Ensuite les cellules ( $1-2 \cdot 10^6$ ) sont ajoutées dans la chambre. Les substrats sont alors ajoutés au fur et à mesure. Le déroulement ainsi que les concentrations des substrats utilisés sont récapitulés dans le tableau ci-dessous. L'intensité respiratoire des cellules intactes (non perméabilisées) a été mesurée en utilisant  $1-2 \times 10^6$  cellules/ml en présence de 5 mM glucose. L'oligomycine est utilisée pour inhiber le complexe I. La digitonine ajoutée est préparée le jour même de l'expérience, en dissolvant 10 mg de digitonine en poudre (sigma D-141) dans 1 ml d'eau distillée sous faible agitation, puis chauffée à 100 °C pendant 2 minutes, pour être finalement incubée à 25 °C. Elle est ajoutée dans le milieu avec une proportion de 100µg de Digitonine par 1 mg de protéine totale ( $\sim 1 \times 10^6$  cellules).

Le Pyruvate et le Malate (2M: 0.8M) ont été utilisés pour induire le transfert d'électrons à partir du NADH jusqu'à O<sub>2</sub> à travers le complexe I.

Le succinate a été utilisé comme donneur d'électrons au niveau du complexe II, quand le complexe I a été inhibé par 0.5 µM roténone. L'intensité respiratoire maximale a été mesurée en présence de l'agent découplant FCCP (50-500 nM) et l'Oligomycine (1 µg/ml). La consommation oxygène non mitochondriale a été mesurée pour chaque expérience par l'addition du 1 mM KCN.

**Tampon de respiration:** 10 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 120 mM KCl and 1 mM EGTA.

<b><u>Substrat</u></b>	Événement	Concentration (solvant)	Stockage (°C)	Titration (volume)	Concentration finale	Syringue (µl)
Glutamate	Glu	2M (H <sub>2</sub> O)	-20	10	10mM	25
Malate	Mal	0.8M (H <sub>2</sub> O)	-20	5	2mM	25
Pyruvate	Pyr	2M (H <sub>2</sub> O)	Frais	5	5mM	25
Succinate	Suc	1M (H <sub>2</sub> O)	-20	20	5mM	50
<b><u>Découplant</u></b>						
FCCCP	Sf	0.1M (EtOH)	-20	1	50nM/étape	10
<b><u>Inhibiteurs</u></b>						
Roténone	Rot	1mM (EtOH)	-20	1	0.5µM	10
Malonate	Mna	2M(H <sub>2</sub> O)	-20	5	5mM	25
Oligomycine	Omy	2mg/ml (EtOH)	-20	1	1µg/ml	10
KCN	Kcn	1M (H <sub>2</sub> O)	Frais	2	1mM	10
<b><u>Digitonine</u></b>	Dig	10mg/ml (H <sub>2</sub> O)	Frais		10µg/1mg de protéine	10

**Tableau 1 : Concentrations et volumes des substrats, inhibiteurs et agent découplant utilisés pour le test de la respiration**



## **Chapitre 2**

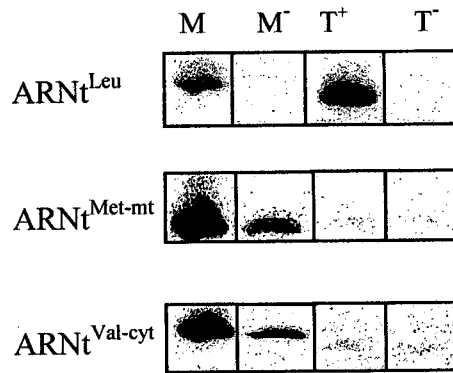
# **RESULTATS**

## 1. Analyse de l'importation mitochondriale des ARNt<sup>Leu</sup> recombinants

Afin de tester si les ARN t<sup>Leu</sup> sont importés dans les mitochondries humaines, des expériences de mutagenèse dirigée ont été réalisées au laboratoire pour avoir des ARNt<sup>Leu</sup> recombinants qui ont un potentiel thérapeutique, c'est-à-dire fonctionnellement, substituer l'ARNt<sup>Leu</sup> mitochondrial portant la mutation MELAS. Les ARNt recombinants devraient pouvoir être aminoacylés par la leucine et importés dans les mitochondries. Puisque les dérivants des trois ARNt<sup>Lys</sup> de *Saccharomyces cerevisiae* (tRK1, tRK2, tRK3) se sont révélés importables dans des mitochondries humaines *in vitro* ainsi que *in vivo*, ils ont été choisis comme base de toutes les nouvelles versions. Dans les cellules humaines, il existe deux leucyl-ARNt synthétases, une cytoplasmique et l'autre mitochondriale. Pour que cette dernière puisse reconnaître son substrat naturel (l'ARNt-Leu mitochondrial), l'ARNt doit contenir la base discriminatrice A73, l'adénine dans la position 14 de D-loop de l'ARNt et, enfin, l'anticodon leucine (UAA pour l'ARNt-Leu(UUR) mitochondrial). Ces éléments ont été intégrés dans les séquences de tRK1, tRK2 et tRK3 par mutagenèse dirigée. Plusieurs versions ont été obtenues. Ces ARNt ont été testés pour leur capacité à être importé dans des mitochondries humaines isolées *in vitro*. Suite à cela, nous avons choisi qu'une seule qui nous a semblé adéquate à notre démarche expérimentale suivante (la publication de Karicheva et al, contiendrait plus de détails concernant les différents détails techniques (Karicheva, Kolesnikova et al.).

Ensuite, pour voir si ces ARNt recombinants sont importés dans les mitochondries humaines *in vivo*, nous avons donc isolé l'ARN total des cellules cybrides MELAS (transfctées de manière stable par un vecteur viral contenant l'ARNt<sup>Leu</sup> recombinants ou par un vecteur vide), et les avons analysé par Hybridation Northern avec des sondes oligonucléotidiques radiomarqués. Dans chaque cas, la procédure consistait en hybridation successives de la même membrane avec des sondes complémentaires à: à une version recombinante d'un ARNt<sup>Leu</sup>, à un ARNt mitochondrial (codé par l'ADN mitochondrial) et à un ARNt cytoplasmique. La sonde dirigée contre l'ARNt recombinant a servi pour mettre en évidence son importation dans les mitochondries, la sonde contre l'ARNt mitochondrial humain nous a renseigné sur la qualité de la préparation d'ARN mitochondrial (non-dégradation); enfin l'hybridation avec la sonde contre l'ARNt cytoplasmique humain a permis de vérifier que la préparation d'ARN mitochondrial n'était pas contaminée par des ARN cytosoliques. Les

analyses de détection d'import des ARNt recombinants ont été réalisées en présence d'ARN total de la levure, qui a servi comme témoin positif. Le témoin négatif a été l'ARN total humain. L'hybridation Northern a démontré que la version d'ARNt<sup>Leu</sup> recombinante est bien présente dans la préparation d'ARN mitochondrial. Les signaux obtenus par hybridation avec la sonde anti-Met confirment la présence d'ARN mitochondrial intact.



**Figure 5: Analyse de l'import de l'ARNt<sup>Leu</sup> recombinant.** M: cellules MELAS transfectées avec vecteur; M- cellules transfectées avec vecteur vide; T+ (l'ARN total de levure) et T- l'ARN total humain « psi » sont les témoins positif et négatif de l'expérience. ARNt<sup>Met-mt</sup>: ARNt pour la méthionine mitochondriale, ARNt<sup>Val-cyt</sup>: l'ARNt valine cytoplasmique.

On peut en conclure que l'ARNt recombinant est importé *in vivo* dans les mitochondries humaines des cellules cybrides transfectées de manière stable par un vecteur virale, ces résultats ont été obtenus notamment par Karicheva, elle a démontré que les cellules cybrides Melas transfecté avec le lentivirus contenant le gène codant pour l'ARNt recombinant, tandis que les cellules transfectés avec le vecteur vide ne contiennent pas l'ARNt<sup>LEU</sup> recombinant (Karicheva, Kolesnikova et al.). Après avoir démontré la présence de ces ARNt<sup>LEU</sup> recombinants, nous avons ensuite procédé à tester leur effet curatif sur les différentes fonctions mitochondriales.

## 2. Etude comparative des protéines mitochondriales de différentes lignées cellulaires

Nous avons analysé plusieurs protéines dont l'altération de synthèse a été reportée chez des patients malades présentant le syndrome MELAS. Au total, trois protéines ont été analysées.

Il s'agit d'une protéine du complexe I de la chaîne respiratoire «NADH déshydrogénase 1, ND1», et de deux protéines du complexe IV cytochrome c oxydase «COX1 et COXII». En plus de ces protéines, nous avons aussi analysé d'autres protéines afin de vérifier la synthèse protéique globale de la cellule et de les utiliser comme protéines de référence. Il s'agit de  $\alpha$ -tubuline, protéine de cytosquelette ubiquitaire, et de la porine (Voltage dependant anion Channel), une protéine mitochondriale codée par l'ADNn. Cette dernière est ancrée dans la membrane mitochondriale et permet le passage des molécules de petite taille du cytoplasme vers les mitochondries.

Les protéines analysées sont obtenues à partir des cellules en culture. Après la migration sur gel et le transfert, la membrane de nitrocellulose a été découpée en trois parties et hybridée avec des anticorps primaires «anti- $\alpha$ -tubuline humain '1/20000', anti ND1 du lapin '1/1000' et anti-COX1 de souris '1/1000'» et secondaires «1/1000». Nous avons également utilisé d'autres anticorps secondaire conjugués à des fluorophores «soit le cyanine 3 ou soit le cyanine5».

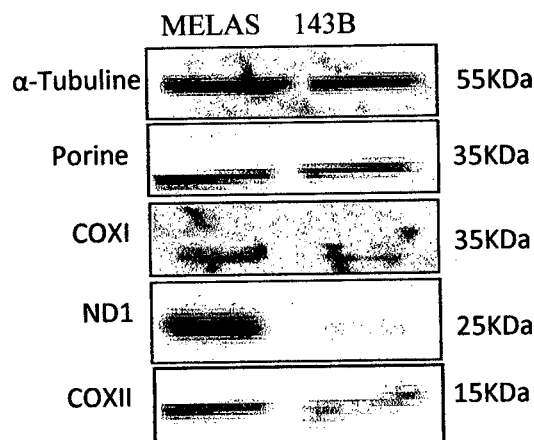
Les résultats obtenus sont présentés dans la figure ci-dessous. Ces signaux ont été quantifiés en utilisant un logiciel de quantification Image Quant (*GE Healthcare*). La méthode de calcul que nous avons utilisée est basée sur :

- la soustraction des intensités de signaux obtenus par rapport à celle de la tubuline, qui est la protéine de référence ;
- Puis une soustraction par rapport aux intensités des cellules 143B, les cellules sauvages.

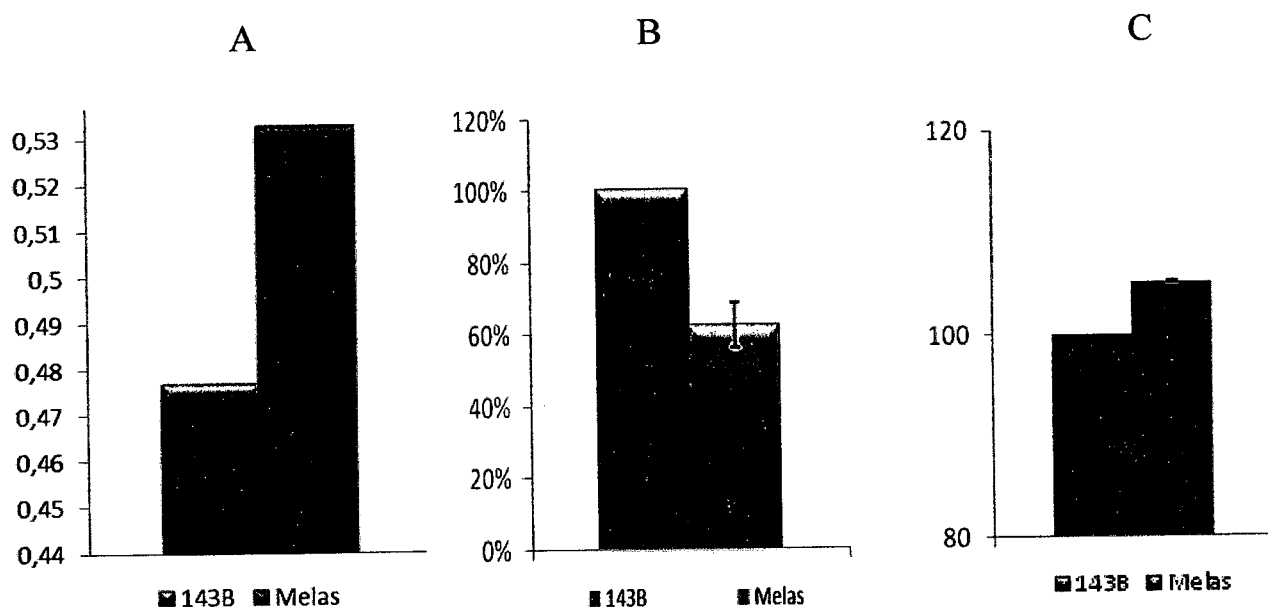
Les résultats obtenus sont ensuite représentés sous forme d'histogrammes.

La concentration que nous avons utilisée est de 30 $\mu$ g par piste. Nous avons opté pour la méthode avec anticorps fluorescents qui nous a semblée plus sensible et dont le bruit de fond est plus faible.

Les résultats obtenus sont présentés sur les figures suivantes :



**Figure 6: Analyse Western des lysats des cellules 143B et de cellules MELAS.** Différentes quantités de lysats (de 10 à 50  $\mu$ g) ont été déposées et différents anticorps ont été utilisés: Anticorps-Anti-tubuline «1/20000», Anticorps-Anti-COXI «1/1000» et Anticorps-Anti-ND1 à 1/1000», Anticorps-Anti-Porine «1/1000» et Anticorps-Anti-COXII «1/1000». Les anticorps secondaires utilisés sont un anticorps de souris conjugué à la cyanine 3 et un anticorps de lapin conjugué à la cyanine 5. Le signal est le résultat de la fluorescence émise suite à l'excitation des fluorochromes. L'Anticorps Anti-tubuline est utilisé comme une référence de quantification. Les bandes sont quantifiées par un logiciel Quant Software de GE Healthcare.



**Figure 7: Histogrammes de quantification des lysats des cellules 143B et MELAS.** Courbe obtenue après quantification des bandes de la figure 6 par *Image Quant Software de GE Healthcare*. L'histogramme A représente la protéine COXII, B représente COXI et C représente COXII. 143B sont les cellules sauvages et les cellules melas sont les cellules contenant l'ARNt recombinant.

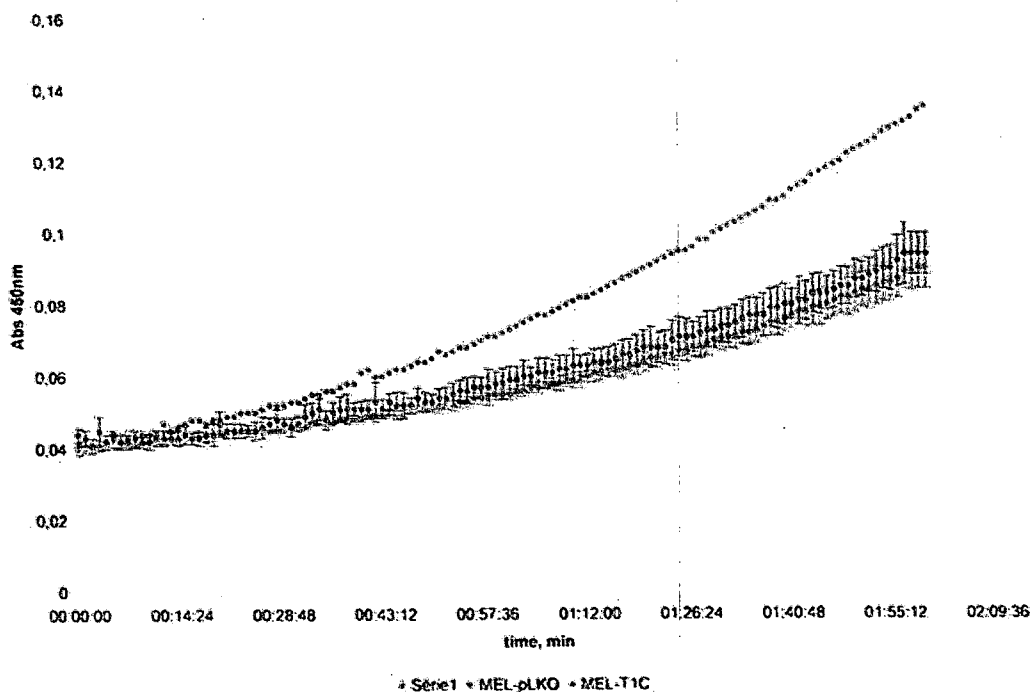
Ces résultats montrent une diminution des différentes protéines. Cela correspond à ce qui a été décrit chez des patients malades ayant le syndrome MELAS (Park, Davidson et al. 2003). Par ailleurs, ces résultats nous montrent aussi que les protéines COXI, COXII et ND1 sont correctement synthétisées dans les cellules Melas ayant les ARNt recombinants. Par ailleurs,

l'analyse des protéines des cellules transfectées avec le vecteur montre aussi une diminution de la traduction mitochondriale des protéines citée ci-haut. Karicheva a pu quant à elle, démontrer que la traduction mitochondriale est améliorée en présence des ARNt recombinants. Nous avons ensuite procédé à d'autres tests pour savoir la présence des transcrits recombinants ont un effet sur l'activité enzymatique des complexes respiratoires.

### 3. Activité enzymatique des complexes I et IV

Avant tout test de l'activité enzymatique ou de la respiration cellulaire, nous avons procédé à des tests de vérification de la culture cellulaire afin de s'assurer de l'absence d'une possible contamination surtout par des mycoplasmes. Nous avons donc poursuivi nos expériences avec des cellules non contaminées.

Notre but est de comparer l'activité enzymatique entre les cellules 143B sauvages et les cellules cybrides MELAS en utilisant une méthode immuno-colorimétrique.

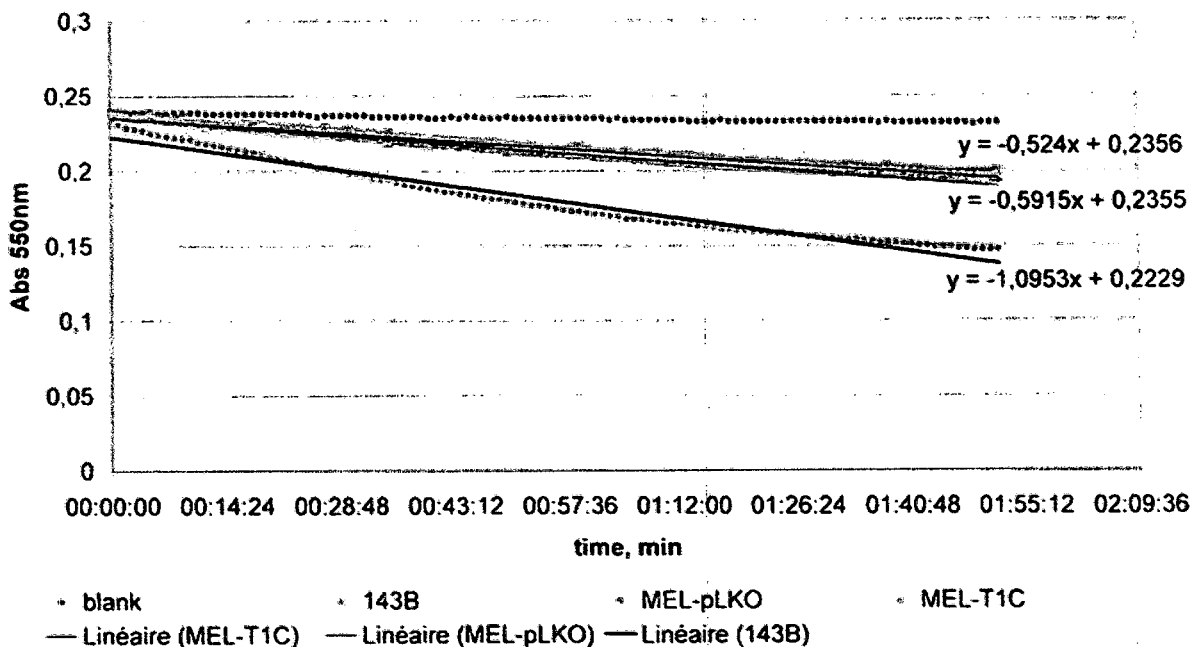


**Figure 8: Analyse de l'activité enzymatique du complexe I de la chaîne respiratoire.** La courbe verte (serie 1) représente l'activité des cellules sauvages 143B et la rouge celle des cellules MELAS transfectée avec le vecteur vide (MEL-PLKO) tandis que la bleue représente MELAS transfectée avec le vecteur contenant l'ARNt<sup>LEU</sup> recombinant (MEL-T1C), l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde  $\lambda=450$  nm.

Une augmentation du signal émis a été observée. Elle est proportionnelle avec le temps d'exposition, au fur et à mesure le signal augmente. Ce signal correspond à l'activité enzymatique du NADH déshydrogénase 1 du complexe I. En effet, la présence de l'enzyme catalyse la réaction d'oxydation du NADH en  $\text{NAD}^+$  provoquant la libération des protons  $\text{H}^+$ , ils seront ensuite utilisés par le fluorophore pour donner le signal. L'activité importante est celle observée chez les cellules 143B, en comparaison à celle des cellules MEL-T1C. l'activité de cette dernière est légèrement élevée par rapport au cellules MEL-pLKO .

En parallèle l'activité enzymatique du complexe IV a aussi été analysée. Dans la figure en bas, une diminution du signal a été observée, elle correspond à la diminution du cytochrome c réduit. Plus l'exposition est longue plus le signal diminue. Donc l'activité la plus importante est celle des cellules 143B sauvages. Par ailleurs l'activité des cellules transfectées avec le vecteur ayant l'ARNt recombinant est légèrement inférieure à celle ayant été transfectées avec le vecteur vide

Ces résultats montrent une diminution de l'activité enzymatique des deux complexes des cellules cybrides porteuse du syndrome MELAS.



**Figure 9: Analyse de l'activité enzymatique du complexe IV de la chaîne respiratoire.** La courbe verte représente l'activité des cellules sauvages 143B et la bleue celle des cellules MELAS transfectée avec le vecteur vide (MEL-PLKO) tandis que la rouge représente celle des cellules MELAS transfectée avec le vecteur contenant l'ARNt<sup>LEU</sup> recombinant (MEL-T1C), l'absorbance est mesurée à une longueur d'onde  $\lambda=550$  nm.

#### 4. Analyse de la respiration cellulaire

L'analyse de la respiration a pour but de mesurer la consommation cellulaire d'oxygène en présence de plusieurs substrats en utilisant l'électrode de Clark. Cette étude a été réalisée sur deux types cellulaires, à savoir, les cellules 143B et les cellules MELAS. Plusieurs substrats ont été utilisés pour voir leur effet sur la respiration :

- le pyruvate et la malate ont été utilisés pour stimuler le transport d'électrons du NADH jusqu'à l'accepteur final «O<sub>2</sub>» ;
- La succinate a été utilisée pour donner les électrons au complexe II et contourner le complexe I.

D'autres agents inhibiteurs et découplants s'ajoutent à cette liste, notamment la roténone, l'inhibiteur du complexe I, l'oligomycine, qui bloque le transport des électrons et la phosphorylation de l'ADP d'où inhibition de la phosphorylation oxydative, et le FCCP qui dissipe artificiellement le gradient de protons et il n'y a plus synthèse d'ATP. Le transfert d'électrons et la consommation d'O<sub>2</sub> sont à leur maximum. Enfin l'oligomycine et le FCCP permettent d'avoir une idée sur la régulation cellulaire de la chaîne respiratoire lorsque le gradient de protons est diminué.

Les études polarographiques permettent de détecter non seulement des déficits de la phosphorylation oxydative, mais aussi des déficits en pyruvate déshydrogénase, les enzymes du cycle de Krebs, des défauts des transporteurs, de cofacteurs d'oxydation (coenzyme A, NAD<sup>+</sup>), puisque toutes ces anomalies conduisent également à une diminution de la production des équivalents réduits utilisés par la mitochondrie (DeLonlay, 2001).

Jusqu'à présent les mesures ont été réalisées uniquement pour comparer l'efficacité respiratoire du complexe I.

Les résultats ci-dessous représentent les différentes variations de la consommation d'oxygène en présence de plusieurs substrats, le taux d'oxygène étant calculé par nmole d'oxygène consommé par minutes et par le nombre de cellules.

Les graphes nous permettent de comparer la respiration des deux lignées cellulaires. En effet, L'intensité respiratoire en présence du glucose est supérieure chez les cellules 143B par rapport aux cellules MELAS. En présence d'oligomycine, l'intensité est diminuée.



Mais la diminution la plus importante est observée chez les cellules MELAS. En présence de Pyr/Mal une forte induction de l'efficacité respiratoire a été observée chez les cellules 143B. Néanmoins, aucun effet n'a été observé chez les cellules MELAS. Quant à l'ajout de la roténone, l'efficacité respiratoire a été fortement réduite par rapport à celle observée après l'ajout du pyruvate/malate «Pyr/Mal», elle est plus importante chez les cellules 143B.

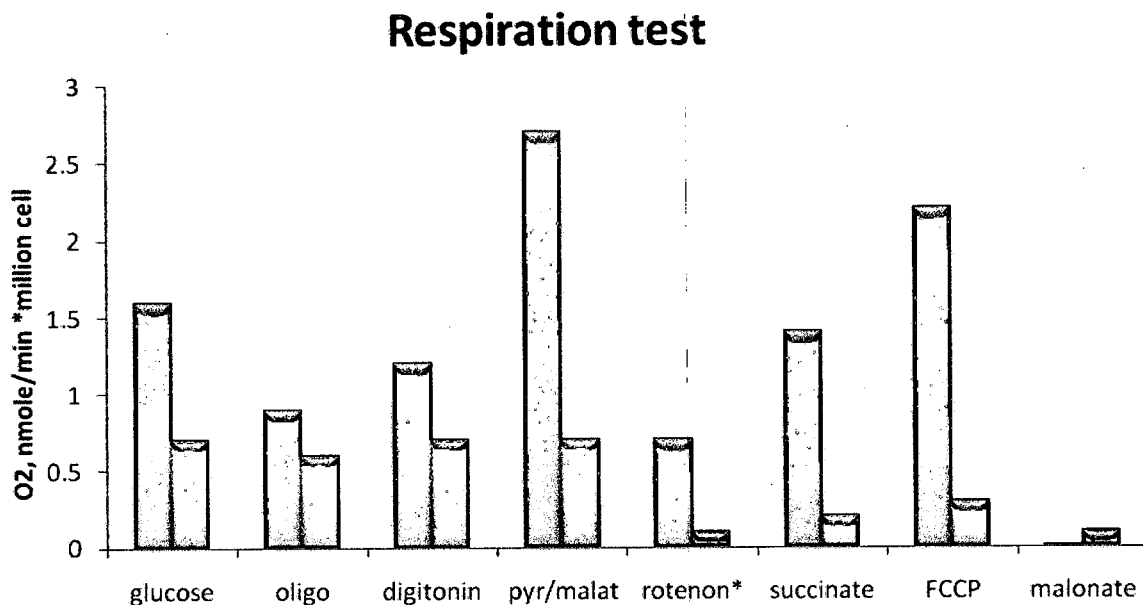


Figure 4: efficacité Respiratoire des cellules 143B (rouge) et les cellules MELAS transfectées avec le vecteur ayant l'ARNt recombinant.

Après l'ajout de la succinate, une augmentation de l'efficacité respiratoire est observée en comparant avec celle qui a été observé quant à l'ajout de la roténone, cette augmentation est la plus importante chez les cellules 143B. Une augmentation de l'efficacité respiratoire a été observée après l'ajout de l'agent découplant FCCP; l'augmentation la plus importante concerne les cellules 143B. La respiration a été majoritairement inhibée lors de l'ajout de l'acide malonique.

# Chapitre 3

## DISCUSSION



L'objectif général de l'étude s'inscrit dans la ligne de recherche du laboratoire ayant pour but de mettre en évidence les mécanismes d'import des ARN dans les mitochondries de levures et humaines. Cette voie d'import pourrait être utilisée à des fins thérapeutiques. Cela dit, que le projet dont mon stage ferait partie était de savoir si la présence des ARN recombinants dans les cellules cybrides en culture pourrait compléter la mutation engendrant le syndrome MELAS. Pour atteindre cet objectif, nous avons choisi de réaliser cette étude sur des cellules cybrides. Ces cellules précédemment décrites, ont été étudiées pour la première fois par King et Attardi en 1989 (King and Attardi 1989).

Au cours de nos expériences, nous avons pu analyser de près les cellules cybrides MELAS, ainsi que l'impact de la mutation **A3243G A>G** sur les différentes fonctions mitochondriales. Nous avons comparé deux types cellulaires, les cellules cybrides MELAS porteuses de la mutation et les cellules 143B, cellules ayant servi à générer ces cybrides. Nos résultats démontrent que la synthèse de plusieurs protéines a été affectée par cette mutation, notamment la NADH déshydrogénase I et la Cytochrome c Oxydase I et II des complexes I et IV de la chaîne respiratoire. Nous avons aussi démontré que plusieurs processus mitochondriaux ont été altérés, en l'occurrence la respiration cellulaire et l'activité enzymatique des complexes I et IV. Quant à la présence de l'ARNt<sup>Leu</sup> mitochondriale, elle a aussi été altérée.

Plusieurs études qui ont été réalisées auparavant confirment les résultats obtenus. En effet, les cellules dont le taux d'hétéroplasmie de la mutation MELAS est supérieur à 94% ont des défauts de synthèse des protéines mitochondriales et une importante réduction de l'activité enzymatique de la chaîne respiratoire (Chomyn, Martinuzzi et al. 1992, King, Koga et al. 1992, Dunbar, Moonie et al. 1996, Janssen, Maassen et al. 1999, Koga, Akita et al. 2000). Des études cliniques réalisées sur des fibroblastes des muscles squelettiques de patients ayant le syndrome MELAS ont révélé un déficit sévère de la chaîne respiratoire tandis que le complexe I est le plus affecté (Mariotti, Savarese et al. 1995, Koga, Akita et al. 2000). Ainsi, de récentes analyses post-mortem des différents tissus des patients présentant le syndrome MELAS ont montré que la quantité protéique du complexe I a diminué de 20% à 30%, et celle du complexe IV de 60% par rapport au contrôle (Fornuskova, Brantova et al. 2008).

Il est évident de nos jours que la mutation MELAS, une substitution de la base Adénine en Guanine à la position 14 de l'ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> mitochondrial, modifie sa structure et sa fonction. L'ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> muté est particulièrement moins chargé par la Leucyl-ARNt Synthétase

mitochondriale (hypo-aminoacylé). Cette mutation diminue le pool de l'ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> aminoacylé de 25% chez les cellules mutantes par rapport aux cellules sauvages. Ainsi, elle peut entraîner une diminution de la traduction mitochondriale. Par ailleurs, il a aussi été démontré que les cellules mutantes A3243G provoquent la perte d'importantes modifications post-transcriptionnelles de l'ARNt<sup>Leu(UUR)</sup> de G10 et U34. Cette dernière est particulièrement requise pour l'interaction codon-anticodon pendant la traduction et pourrait réduire le taux de la traduction mitochondriale (Park, Davidson et al. 2003). De plus, des études récentes ont prouvé que l'incorporation d'acides aminés par erreur pendant la traduction contribue elle aussi à une mauvaise traduction mitochondriale (Park, Davidson et al. 2003).

Bien que des progrès aient été accomplis par plusieurs groupes de recherches dans le but de caractériser les défauts biochimiques liés à cette mutation dans les tissus et les cellules cybrides, le mécanisme moléculaire sous-jacent de cette pathologie reste sujet à caution du fait de l'origine génétique du modèle cellulaire utilisé, que ce soit les cellules cybrides ou les cellules primaires «myoblastes» (Park, Davidson et al. 2003, Sasarman, Antonicka et al. 2008).

Un des mécanismes proposés stipule que le phénotype pathogénique de la mutation est lié à la diminution d'ARNt<sup>Leu</sup> aminoacylé chez ces cellules mutantes, puisque la surexpression de la Leucyl-ARNt Synthétase augmente la stabilité de ces ARNt et que cette augmentation est liée directement à l'augmentation de la traduction mitochondriale (King, Koga et al. 1992).

D'autre part, le deuxième modèle suggéré par Shourbridge et ses collègues stipule que la pathologie liée à la mutation est non seulement due à la diminution de l'aminocyclation mais aussi à la misincorporation d'autres aminoacides à la place de la Leucine dans la traduction mitochondriale. Par conséquent, la synthèse protéique diminue, les complexes de la chaîne respiratoire ne se forment pas et, finalement, ce dysfonctionnement mène à une diminution des activités enzymatiques. Apparaissent alors des signes cliniques liés à ce syndrome. Cette équipe a montré que la surexpression du facteur d'élongation de la traduction restaure et supprime partiellement le phénotype engendré par la mutation (Sasarman, Antonicka et al. 2008).

Quel que soit le mécanisme moléculaire suggéré pour expliquer le phénotype pathogénique lié à cette mutation, notre analyse des fonctions mitochondriales des cellules cybrides MELAS appuie un de ces mécanismes engendré par la mutation m.3243A>G MELAS. Une

diminution de la disponibilité et de l'aminocyclation de l'ARNt<sup>Leu (UUR)</sup> mitochondriale peut conduire en général à de sévères déficiences de la traduction mitochondriales et par conséquent à une diminution de la disponibilité des protéines de la chaîne respiratoire. Il en résulte une affection de l'activité enzymatique suivie d'une diminution du taux de la respiration cellulaire. Par ailleurs, ces données nous permettent de choisir les paramètres les plus adaptés pour tester l'effet de l'ARN recombinant sur l'aminocyclation, la traduction mitochondriale et la disponibilité des protéines mitochondriales.

Toutefois, différents tests ont été réalisés au laboratoire d'accueil sur des ARNt<sup>Lys</sup> recombinants afin de les utiliser comme agent thérapeutique pouvant compléter la mutation dans le gène codant pour l'ARNt<sup>Leu</sup>

En effet, plusieurs mutations ont été introduites dans la structure des trois versions de l'ARNt<sup>Lys</sup> (tk1, tk2 et tk3) de levure afin d'obtenir l'identité de l'ARNt<sup>Leu</sup> et garder les déterminants d'import de l'ARNt<sup>Lys</sup>. Ainsi, des tests d'import dans des mitochondries humaines isolées, d'aminocyclation par Leucyl-ARNt synthétase ont été réalisés *in vitro*.

Le principe de cette étude est le même que ce qui a été réalisé au préalable au laboratoire sur la mutation MERRF (Kolesnikova, Entelis et al. 2004). Les chercheurs ont réussi à utiliser la voie d'import de l'ARNt<sup>Lys</sup> dans les mitochondries humaines afin de compléter cette mutation et de restaurer partiellement les fonctions mitochondriales. Cela a incité les chercheurs à essayer de faire la même chose avec la mutation MELAS, une des plus fréquentes mutations.

Les premiers résultats obtenus ont été encourageants. Il a été mis en évidence que les ARNt<sup>Leu</sup> recombinants sont importés dans les mitochondries humaines isolées et aminocyclées par la Leucyl-ARNt Synthétase humaine *in vitro*.

A la suite des résultats obtenus durant le stage, il est envisageable de tester l'approche *in vivo* sur ces cellules. En effet, la première étape serait de reproduire l'effet de ces ARN recombinants dans les cellules humaines en culture. Ceci pourrait être fait en utilisant les cellules cybrides.

Les résultats de la transfection transitoire obtenus récemment montrent qu'il y a une augmentation de certaines enzymes des complexes de la chaîne respiratoire qui semblent altérées par la mutation MELAS. Ainsi, les premiers résultats de la transfection stable

(Analyse Northern Blot des ARN mitochondriaux) montrent la présence de certaines versions des ARNt recombinants dans les mitochondries humaines des cellules MELAS (durant mon stage j'ai pu démontrer la présence de ces ARNt recombinants dans les mitochondries des cellules cybrides . Ce qui montre que la transfection stable a bien été fonctionnelle car la présence de ces ARNt n'a pas été détectée chez les cellules cybrides MELAS non transfectées ou transfectées par un vecteur vide. En plus, les cellules transfectées ont intégré l'ARNt recombinant dans leur génome, et l'ont transcrit et traduit dans le cytosol. Cet ARNt a donc été adressé dans les mitochondries des cellules cybrides MELAS. Toutefois, l'effet thérapeutique de ces ARN recombinants dans les mitochondries serait analysé. Ainsi, la consommation d'oxygène, l'activité enzymatique des complexes I et IV et les différentes protéines affectées par la mutation seront étudiées.

Par ailleurs, une deuxième étape pourrait consister à tester cette approche au niveau tissulaire. Le principe de ce modèle est la régénération de fibres musculaires humaines dans le muscle biopsie d'une souris. Elle consisterait à transfecter des myoblastes des patients malades et les injecter dans des souris SCID (Severe Combined Immunodeficiency = Immunodéficience sévère combinée) (Clark, Watt et al. 1998). Enfin, dans le futur, il serait envisageable d'effectuer les tests sur un modèle animal.

## **CONCLUSION**

A présent, plusieurs études dont la nôtre ont montré que les cellules cybrides sont un modèle très utile pour étudier les maladies mitochondriales. En plus, l'import d'ARN dans les mitochondries semblerait être un outil important car, outre la compréhension du mécanisme moléculaire d'import dans les mitochondries, il est un outil important pour adresser des molécules thérapeutiques dans les mitochondries. Une telle avancée permettrait, dans le futur, de guérir des maladies mitochondriales jugées sévères et rares.

## Références Bibliographiques

- Adams, K. L. and J. D. Palmer (2003). "Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus." Molecular Phylogenetics and Evolution **29**(3): 380-395.
- Bayona-Bafaluy, M. P., B. Blits, B. J. Battersby, E. A. Shoubridge and C. T. Moraes (2005). "Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(40): 14392-14397.
- Börner, G. V., M. Zeviani, V. Tiranti, F. Carrara, S. Hoffmann, K. D. Gerbitz, H. Lochmüller, D. Pongratz, T. Klopstock, A. Melberg, E. Holme and S. Pflüger (2000). "Decreased aminoacylation of mutant tRNAs in MELAS but not in MERRF patients." Human Molecular Genetics **9**(4): 467-475.
- Chang, D. D. and D. A. Clayton (1985). "Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter." Proceedings of the National Academy of Sciences **82**(2): 351-355.
- Chomyn, A., J. A. Enriquez, V. Micol, P. Fernandez-Silva and G. Attardi (2000). "The Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episode Syndrome-associated Human Mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) Mutation Causes Aminoacylation Deficiency and Concomitant Reduced Association of mRNA with Ribosomes." Journal of Biological Chemistry **275**(25): 19198-19209.
- Chomyn, A., A. Martinuzzi, M. Yoneda, A. Daga, O. Hurko, D. Johns, S. T. Lai, I. Nonaka, C. Angelini and G. Attardi (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." Proceedings of the National Academy of Sciences **89**(10): 4221-4225.
- Clark, K. M., D. J. Watt, R. N. Lightowers, M. A. Johnson, J. B. Relvas, J. W. Taanman and D. M. Turnbull (1998). "SCID mice containing muscle with human mitochondrial DNA mutations. An animal model for mitochondrial DNA defects." The Journal of Clinical Investigation **102**(12): 2090-2095.
- Comte, C. (2010). "Caractérisation d'ARN artificiels importables dans les mitochondries humaines à des fins thérapeutiques".
- Desagher, S. and J.-C. Martinou (2000). "Mitochondria as the central control point of apoptosis." Trends in Cell Biology **10**(9): 369-377.
- DiMauro, S. (2004). "Mitochondrial medicine." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1659**(2-3): 107-114.
- DIMAURO, S. and G. DAVIDZON (.2005). "Mitochondrial DNA and disease." Annals of Medicine **37**:: 222-232.
- Dunbar, D. R., P. A. Moonie, M. Zeviani and I. J. Holt (1996). "Complex I deficiency is Associated with 3243G:C Mitochondrial DNA in Osteosarcoma Cell Cybrids." Human Molecular Genetics **5**(1): 123-129.

Dussurget, O. and D. Roulland-Dussoix (1994). "Rapid, sensitive PCR-based detection of mycoplasmas in simulated samples of animal sera." Applied and Environmental Microbiology **60**(3): 953-959.

Fernandez-Silva, P., J. A. Enriquez and J. Montoya (2003). "Replication and transcription of mammalian mitochondrial DNA." Experimental Physiology **88**(1): 41-56.

Flierl, A., H. Reichmann and P. Seibel (1997). "Pathophysiology of the MELAS 3243 Transition Mutation." Journal of Biological Chemistry **272**(43): 27189-27196.

Fornuskova, D., O. Brantova, M. Tesarova, L. Stiburek, T. Honzik, L. Wenchich, E. Tietzeova, H. Hansikova and J. Zeman (2008). "The impact of mitochondrial tRNA mutations on the amount of ATP synthase differs in the brain compared to other tissues." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease **1782**(5): 317-325.

Goddard, J. P. (1978). "The structures and functions of transfer RNA." Progress in Biophysics and Molecular Biology **32**: 233-308.

Goto, Y.-i., I. Nonaka and S. Horai (1990). "A mutation in the tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene associated with the MELAS subgroup of mitochondrial encephalomyopathies." Nature **348**(6302): 651-653.

Helm, M., C. Florentz, A. Chomyn and G. Attardi (1999). "Search for differences in post-transcriptional modification patterns of mitochondrial DNA-encoded wild-type and mutant human tRNA<sup>Lys</sup> and tRNA<sup>Leu</sup>(UUR)." Nucleic Acids Research **27**(3): 756-763.

Iborra, F., H. Kimura and P. Cook (2004). "The functional organization of mitochondrial genomes in human cells." BMC Biology **2**(1): 9-9.

Janssen, G. M. C., J. A. Maassen and J. M. W. van den Ouweland (1999). "The Diabetes-associated 3243 Mutation in the Mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) Gene Causes Severe Mitochondrial Dysfunction without a Strong Decrease in Protein Synthesis Rate." Journal of Biological Chemistry **274**(42): 29744-29748.

Kaguni, L. S. (2004). "DNA POLYMERASE $\gamma$ , THE MITOCHONDRIAL REPLICASE 1." Annual Review of Biochemistry **73**(1): 293-320.

Karicheva, O. Z., O. A. Kolesnikova, T. Schirtz, M. Y. Vysokikh, A.-M. Mager-Heckel, A. Lombardi, A. Boucheham, I. A. Krashennikov, R. P. Martin, N. Entelis and I. Tarassov "Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the MT-TL1 gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria." Nucleic Acids Research **39**(18): 8173-8186.

King, M. P. and G. Attardi (1989). "Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation." Science **246**(4929): 500-503.

King, M. P., Y. Koga, M. Davidson and E. A. Schon (1992). "Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA(Leu(UUR)) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes." Molecular and Cellular Biology **12**(2): 480-490.

Kirino, Y., T. Yasukawa, S. Ohta, S. Akira, K. Ishihara, K. Watanabe and T. Suzuki (2004). "Codon-specific translational defect caused by a wobble modification deficiency in mutant tRNA from a



human mitochondrial disease." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**(42): 15070-15075.

Koga, Y., Y. Akita, N. Takane, Y. Sato and H. Kato (2000). "Heterogeneous presentation in A3243G mutation in the mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) gene." Archives of Disease in Childhood **82**(5): 407-411.

Kolesnikova, O. A., N. S. Entelis, C. Jacquin-Becker, F. Goltzene, Z. M. Chrzanowska-Lightowlers, R. N. Lightowlers, R. P. Martin and I. Tarassov (2004). "Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells." Human Molecular Genetics **13**(20): 2519-2534.

Kolesnikova, O. A., N. S. Entelis, C. Jacquin-Becker, F. Goltzene, Z. M. Chrzanowska-Lightowlers, R. N. Lightowlers, R. P. Martin and I. Tarassov (2004). "Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells." Hum Mol Genet **13**(20): 2519-2534.

Kolesnikova, O. A., N. S. Entelis, H. Mireau, T. D. Fox, R. P. Martin and I. A. Tarassov (2000). "Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm." Science **289**(5486): 1931-1933.

Krishnan, K. J., A. K. Reeve, D. C. Samuels, P. F. Chinnery, J. K. Blackwood, R. W. Taylor, S. Wanrooij, J. N. Spelbrink, R. N. Lightowlers and D. M. Turnbull (2008). "What causes mitochondrial DNA deletions in human cells?" Nature Genetics **40**(3): 275-279.

Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.

Larsen, N. B., M. Rasmussen and L. J. Rasmussen (2005). "Nuclear and mitochondrial DNA repair: similar pathways?" Mitochondrion **5**(2): 89-108.

Legros, F., F. Malka, P. Frachon, A. Lombes and M. Rojo (2004). "Organization and dynamics of human mitochondrial DNA." Journal of Cell Science **117**(13): 2653-2662.

Lill, R., R. Dutkiewicz, H.-P. Elsässer, A. Hausmann, D. J. A. Netz, A. J. Pierik, O. Stehling, E. Urzica and U. Mühlenhoff (2006). "Mechanisms of iron-sulfur protein maturation in mitochondria, cytosol and nucleus of eukaryotes." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research **1763**(7): 652-667.

Luft, R., D. Ikkos, G. Palmieri, L. Ernster and B. r. Afzelius (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." The Journal of Clinical Investigation **41**(9): 1776-1804.

Manfredi, G., J. Fu, J. Ojaimi, J. E. Sadlock, J. Q. Kwong, J. Guy and E. A. Schon (2002). "Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus." Nat Genet **30**(4): 394-399.

Mariotti, C., N. Savarese, A. Suomalainen, M. Rimoldi, G. Comi, A. Prella, C. Antozzi, S. Servidei, L. Jarre, S. DiDonato and M. Zeviani (1995). "Genotype to phenotype correlations in mitochondrial

encephalomyopathies associated with the A3243G mutation of mitochondrial DNA." Journal of Neurology **242**(5): 304-312-312-304-312-312.

Martin, R. P., J. M. Schnell, A. J. Stahl and G. Dirheimer (1979). "Import of nuclear deoxyribonucleic acid coded lysine-accepting transfer ribonucleic acid (anticodon C-U-U) into yeast mitochondria." Biochemistry **18**(21): 4600-4605.

Meziane, A. E., S. K. Lehtinen, N. Hance, L. G. J. Nijtmans, D. Dunbar, I. J. Holt and H. T. Jacobs (1998). "A tRNA suppressor mutation in human mitochondria." Nature Genetics **18**(4): 350-353.

MITOMAP (2011). "<http://www.mitomap.org>, A Human Mitochondrial Genome Database."

Montoya, J., T. Christianson, D. Levens, M. Rabinowitz and G. Attardi (1982). "Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA." Proceedings of the National Academy of Sciences **79**(23): 7195-7199.

Moslemi, A.-R. and N. Darin (2007). "Molecular genetic and clinical aspects of mitochondrial disorders in childhood." Mitochondrion **7**(4): 241-252.

Ojala, D., J. Montoya and G. Attardi (1981). "tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria." Nature **290**(5806): 470-474.

Park, H., E. Davidson and M. P. King (2003). "The Pathogenic A3243G Mutation in Human Mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) Decreases the Efficiency of Aminoacylation " Biochemistry **42**(4): 958-964.

Pavakis, S. G., P. C. Phillips, S. DiMauro, D. C. De Vivo and L. P. Rowland (1984). "Mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and strokelike episodes: A distinctive clinical syndrome." Annals of Neurology **16**(4): 481-488.

Payne, A. H. and D. B. Hales (2004). "Overview of Steroidogenic Enzymes in the Pathway from Cholesterol to Active Steroid Hormones." Endocrine Reviews **25**(6): 947-970.

Rinehart, J., B. Krett, M. A. Rubio, J. D. Alfonzo and D. Soll (2005). "Saccharomyces cerevisiae imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion." Genes Dev **19**(5): 583-592.

Rustin, Pierre, Jacobs, T. Howard, Dietrich, Andr, Lightowlers, N. Robert, Tarassov, Ivan, D. Corral and Marisol (2007). Adresser du matériel allogène dans le compartiment mitochondrial : Un défi pour comprendre la physiologie mitochondriale et une perspective pour la thérapie. Sèvres, FRANCE, EDK.

Sacconi, S., L. Salviati, Y. Nishigaki, W. F. Walker, E. Hernandez-Rosa, E. Trevisson, S. Delplace, C. Desnuelle, S. Shanske, M. Hirano, E. A. Schon, E. Bonilla, D. C. De Vivo, S. DiMauro and M. M. Davidson (2008). "A functionally dominant mitochondrial DNA mutation." Human Molecular Genetics **17**(12): 1814-1820.

Sagan, L. (1967). "On the origin of mitosing cells." Journal of Theoretical Biology **14**(3): 225-274, IN221-IN226-225-274, IN221-IN226.

Saraste, M. (1999). "Oxidative Phosphorylation at the fin de siècle." Science **283**(5407): 1488-1493.  
Sasarman, F., H. Antonicka and E. A. Shoubridge (2008). "The A3243G tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) MELAS mutation causes amino acid misincorporation and a combined respiratory chain assembly defect

partially suppressed by overexpression of EFTu and EFG2." Human Molecular Genetics **17**(23): 3697-3707.

Schapira, A. H. V. (2006). "Mitochondrial disease." The Lancet **368**(9529): 70-82.

Schon, E. A., S. DiMauro, M. Hirano and R. W. Gilkerson (2010). "Therapeutic prospects for mitochondrial disease." Trends in Molecular Medicine **16**(6): 268-276.

Shanske, S., J. Pancrudo, P. Kaufmann, K. Engelstad, S. Jhung, J. Lu, A. Naini, S. DiMauro and D. C. De Vivo (2004). "Varying loads of the mitochondrial DNA A3243G mutation in different tissues: Implications for diagnosis." American Journal of Medical Genetics Part A **130A**(2): 134-137.

Smith, P. M., G. F. Ross, R. W. Taylor, D. M. Turnbull and R. N. Lightowlers (2004). "Strategies for treating disorders of the mitochondrial genome." Biochim Biophys Acta **1659**(2-3): 232-239.

Smith, P. M., G. n. F. Ross, R. W. Taylor, D. M. Turnbull and R. N. Lightowlers (2004). "Strategies for treating disorders of the mitochondrial genome." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1659**(2-3): 232-239.

Sohm, B. n. d., M. Frugier, H. Bruli<sup>1</sup>/<sub>2</sub>, K. Olszak, A. Przykorska and C. Florentz (2003). "Towards Understanding Human Mitochondrial Leucine Aminoacylation Identity." Journal of Molecular Biology **328**(5): 995-1010.

St-Pierre, J., J. A. Buckingham, S. J. Roebuck and M. D. Brand (2002). "Topology of Superoxide Production from Different Sites in the Mitochondrial Electron Transport Chain." Journal of Biological Chemistry **277**(47): 44784-44790.

Taylor, R. W., P. F. Chinnery, K. M. Clark, R. N. Lightowlers and D. M. Turnbull (1997). "Treatment of Mitochondrial Disease." Journal of Bioenergetics and Biomembranes **29**(2): 195-205-205-195-205-205.

Taylor, R. W., P. F. Chinnery, D. M. Turnbull and R. N. Lightowlers (1997). "Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication in vitro by peptide nucleic acids." Nat Genet **15**(2): 212-215.

Taylor, R. W. and D. M. Turnbull (2005). "Mitochondrial DNA mutations in human disease." Nature Reviews Genetics **6**(5): 389-402.

Tuppen, H. A. L., E. L. Blakely, D. M. Turnbull and R. W. Taylor (2010). "Mitochondrial DNA mutations and human disease." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics **1797**(2): 113-128.

Turnbull, D. M. and R. N. Lightowlers (2002). "A roundabout route to gene therapy." Nature Genetics **30**(4): 345-346.

van Eijsden, R. G., L. M. Eijssen, P. J. Lindsey, C. M. van den Burg, L. E. de Wit, M. E. Rubio-Gozalbo, C. E. de Die, T. Ayoubi, W. Sluiter, I. F. a. de Coö and H. J. Smeets (2008). "Termination of damaged protein repair defines the occurrence of symptoms in carriers of the m.3243A > G tRNA(Leu) mutation. ." J Med Genet **45**: 525-534.

Wallace, D. C. (1999). "Mitochondrial Diseases in Man and Mouse." Science **283**(5407): 1482-1488.

Wallace, D. C. (2005). "The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: On the road to therapeutics and performance enhancement." Gene **354**: 169-180.

Wittenhagen, L. M. and S. O. Kelley (2003). "Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function." Trends in Biochemical Sciences **28**(11): 605-611.

Wong, L.-J. C. (2010). "Molecular genetics of mitochondrial disorders." Developmental Disabilities Research Reviews **16**(2): 154-162.

Yasukawa, T., Y. Kirino, N. Ishii, I. J. Holt, H. T. Jacobs, T. Makifuchi, N. Fukuhara, S. Ohta, T. Suzuki and K. Watanabe (2005). "Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases." FEBS Letters **579**(13): 2948-2952.

Yasukawa, T., A. Reyes, T. J. Cluett, M.-Y. Yang, M. Bowmaker, H. T. Jacobs and I. J. Holt (2006). "Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand." EMBO Journal **25**(22): 5358-5371.

Yasukawa, T., T. Suzuki, T. Suzuki, T. Ueda, S. Ohta and K. Watanabe (2000). "Modification Defect at Anticodon Wobble Nucleotide of Mitochondrial tRNAs<sup>Leu</sup>(UUR) with Pathogenic Mutations of Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis, and Stroke-like Episodes." Journal of Biological Chemistry **275**(6): 4251-4257.

# Correction of the consequences of mitochondrial 3243A>G mutation in the *MT-TL1* gene causing the MELAS syndrome by tRNA import into mitochondria

Olga Z. Karicheva<sup>1,2</sup>, Olga A. Kolesnikova<sup>1,2</sup>, Tom Schirtz<sup>1</sup>, Mikhail Y. Vysokikh<sup>1,3</sup>, Anne-Marie Mager-Heckel<sup>1</sup>, Anne Lombès<sup>4</sup>, Abdeldjalil Boucheham<sup>1</sup>, Igor A. Krasheninnikov<sup>2</sup>, Robert P. Martin<sup>1</sup>, Nina Entelis<sup>1</sup> and Ivan Tarassov<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>UMR 7156 University of Strasbourg (UdS) - CNRS, Molecular Genetics, Genomics & Microbiology, Strasbourg 67084, France, <sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Biology Faculty, <sup>3</sup>Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, M. V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia 119991 and <sup>4</sup>Centre de Recherche de l'Institut du Cerveau et de la Moëlle (CRICM); INSERM UMRS 975, CNRS UMR 7225, UPMC, Paris, France 75651

Received March 22, 2011; Revised and Accepted June 14, 2011

## ABSTRACT

Mutations in human mitochondrial DNA are often associated with incurable human neuromuscular diseases. Among these mutations, an important number have been identified in tRNA genes, including 29 in the gene *MT-TL1* coding for the tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. The m.3243A>G mutation was described as the major cause of the MELAS syndrome (mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes). This mutation was reported to reduce tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> aminoacylation and modification of its anti-codon wobble position, which results in a defective mitochondrial protein synthesis and reduced activities of respiratory chain complexes. In the present study, we have tested whether the mitochondrial targeting of recombinant tRNAs bearing the identity elements for human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase can rescue the phenotype caused by MELAS mutation in human transmitochondrial cybrid cells. We demonstrate that nuclear expression and mitochondrial targeting of specifically designed transgenic tRNAs results in an improvement of mitochondrial translation, increased levels of mitochondrial DNA-encoded respiratory complexes subunits, and significant rescue of respiration. These findings prove the possibility to direct tRNAs with changed aminoacylation

specificities into mitochondria, thus extending the potential therapeutic strategy of allotopic expression to address mitochondrial disorders.

## INTRODUCTION

The m.3243A>G mutation in the mitochondrial DNA (mtDNA) *MT-TL1* gene coding for mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> (mt-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>) was first identified as a genetic cause of mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episodes (MELAS, MIM 5400 000) (1). It is one of the most common mitochondrial pathogenic mutations with a carrier frequency estimated in the range between 0.95 and 18.4/100 000 in northern European populations (2–4). Like many mutations affecting mitochondrial respiratory chain, the m.3243A>G mutation is associated not only with MELAS, but also with other clinical phenotypes, including CPEO (Chronic Progressive External Ophthalmoplegia), DMDF (Diabetes Mellitus and Deafness), etc. (5). In all cases, the m.3243A>G mutation was present in a heteroplasmic state, which means the co-existence of mutant and wild-type mtDNA molecules in one cell. The proportion of mutant mtDNA molecules that leads to the manifestation of the disease varied strongly in different tissues (6). Patients with m.3243A>G mutation often show severe respiratory chain deficiency with complexes I and IV affected in a first place (7,8), but the precise mechanism connecting the mutation with clinical phenotypes is still

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +33 368851481; Fax: +33 388417087; Email: i.tarassov@unistra.fr  
Present addresses:

Olga Z. Karicheva, Research Institute of the Biotechnology School of Strasbourg, UMR 7242, Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg; 67412 Illkirch, France.

Olga A. Kolesnikova, Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS/INSERM/ULP, 67404, Illkirch Cedex, France.

© The Author(s) 2011. Published by Oxford University Press.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>), which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

not fully understood. Accumulated data, mostly obtained on *trans*mitochondrial cybrid cells, suggest a deficiency of aminoacylation of mutant mt-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> (9–13) and hypomodification of its anti-codon wobble position affecting recognition of UUG codons (14–17) to be the origin of a mitochondrial translation defect. This leads to a decrease of respiratory chain complexes steady-state levels (7,18) and affected respiration rate (11,19,20). The mitochondrial translation defect observed varied from moderate in some cell lines to severe in others. Moreover, different groups reported qualitatively different patterns of mitochondrial translation in cells bearing the m.3243A>G mutation. In association with the mutation, it has been observed that there was a specific decrease of polypeptides rich in UUG codons (for instance, ND6) and appearance of abortive translation products (18,20). In other reports, no qualitative differences or specific correlation between number of leucine UUR codons and level of synthesis of particular mitochondrial proteins were found (11,21). The data on amino acid misincorporation at UUR codons are also somewhat controversial (18,22,23).

Up to now, no efficient therapy for MELAS and other mitochondrial diseases has been demonstrated. Antioxidants and vitamins have been used, but there have been no consistent successes reported (24). Spindle transfer, where the nuclear DNA is transferred to another healthy egg cell leaving the defective mtDNA behind, is a potential treatment procedure that has been successfully carried out on monkeys (25). Using a similar pronuclear transfer technique, healthy DNA in human eggs from women with mitochondrial disease was successfully transplanted into the eggs of women donors who were unaffected (26). Embryonic mitochondrial transplant and protofection have been proposed as a possible treatment for inherited mitochondrial disease. Allotopic expression of mitochondrial proteins (i.e. expression of mtDNA-encoded mitochondrial proteins in the nucleus) was also tested as a radical treatment for mtDNA mutation load. Promising results were obtained with MELAS cybrid cells overexpressing the mitochondrial leucyl-tRNA synthetase (mt-LeuRS) (27,28). Authors observed an increase in steady-state level of aminoacylated mt-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, partial restoration of COX1, COX2 and ND1 steady-state levels and increase of respiration rate. Interestingly, the rate of mitochondrial protein synthesis was almost the same as that in parental cells bearing MELAS mutation. Authors suggested that mutation suppression occurred via a mechanism that increased protein stability rather than translation rate. In an independent study, overexpression of mitochondrial translation factors EFTu and EFG2 in myoblasts derived from a MELAS patient partially restored mitochondrial translation, steady-state levels of certain respiratory chain subunits, assembly and activity of the OXPHOS complexes (18). A similar approach was also formerly and successfully modelled in yeast (29).

In addition to proteins, human mitochondria also import from the cytosol small RNAs such as 5S rRNA (30–32,34), tRNA<sup>Gln</sup> (33), or RNase P and MRP RNA components (35,36). Moreover, we previously demonstrated that yeast importable tRNA<sup>Lys</sup> derivatives

and some other small artificial RNA substrates could be imported into mitochondria after their expression in human cells (37,38). We have shown that yeast tRNA<sup>Lys</sup> derivatives targeted to mitochondria of cybrid cells or patient fibroblasts with the m.8344A>G mutation in the mtDNA *MT-TK* gene coding for mt-tRNA<sup>Lys</sup> (commonly associated with the MERRF syndrome) partially restored their mitochondrial translation, activity of respiratory complexes, electrochemical potential across the mitochondrial inner membrane and respiration rate (39). In order to enlarge the spectrum of mtDNA mutations addressed we investigated here the possibility to rescue the MELAS mutation by allotopic expression of recombinant and importable tRNAs whose aminoacylation identity had been changed from lysine to leucine.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell culture

The MELAS cybrid cell line used in this study was kindly provided by E. A. Shoubridge (Montreal Neurologic Institute, Quebec, Canada). It carried  $90 \pm 5\%$  of m.3243A>G mutation and was functionally characterized previously (40). They were generated by fusing rho<sup>0</sup> cells from osteosarcoma cell line 143B.TK<sup>-</sup> with cytoplasts from clonal primary myoblasts established from a patient carrying the m.3243A>G point mutation in *MT-TL1* gene (MELAS mutation) as described elsewhere (41). Cybrid cells were cultivated in DMEM medium with high glucose (4.5 g/l), sodium pyruvate (110 mg/l) and L-glutamine (2 mM) from Sigma, supplemented with 10% (w:v) fetal calf serum (FCS), 50 mg/ml uridine, standard concentrations of antibiotics (penicillin, streptomycin and fungizone) and, for stable transfectants, 2 µg/ml of puromycin. 143Brho<sup>+</sup> cells were used as healthy cell control and were cultivated in the same conditions as MELAS cybrid cells. HEK-293T cells were used for production of lentiviral particles and were cultivated in standard DMEM medium with 1 g/l glucose. All cell lines were cultivated at 37°C and 5% of CO<sub>2</sub>.

### Cell transfection

Transfection of MELAS cybrid cells with tRNA transcripts was performed using Lipofectamine2000 (Invitrogen) as described previously (32) with minor modifications: 1 µg of transcript and 12.5 µl Lipofectamine2000 were used per  $2 \times 10^6$  cells. Transient transfection was performed with a mix of 4 µg of pBK-CMV-tRK plasmid and 12 µl of Lipofectamine2000 per  $600 \times 10^3$  cells according to manufacturer protocol. Efficiency of transfection was estimated by FACS analysis of GFP expression from pmax-GFP plasmid transfected in parallel. MELAS cybrid cells stably expressing recombinant tRNAs were obtained by lentiviral transfection. Production of lentiviral particles was performed in HEK-293T cells using FuGENE6 transfection reagent (Roche Applied Sciences), 3 µg of pLKO.1-tRK (Addgene), 1.5 µg of pLP1, 0.75 µg of pLP2 and 0.75 µg pLP-VSGV packaging plasmids (Invitrogen) according to manufacturer protocol. Infection of MELAS cybrid cells was performed with

virus-containing medium from HEK-293T cells during 2–3 days. Cells containing transgenes were selected in the presence of 2 µg/ml of puromycin during 2–3 days.

### Construction of recombinant tRNA genes and plasmids

The hmtLeuRS gene without mitochondria-targeting sequence (186–302 nucleotides coding for the first 39 amino acids), was PCR-amplified from cDNA purchased from the RIKEN collection and cloned in the expression pET3a (Amp<sup>r</sup>) vector.

Cloning of yeast tRK1, tRK2 (G1-C72; G73; U34) and tRK3 genes was performed previously (42). tRNA genes coding sequences were placed under control of T7 promoter in pUC19 (Amp<sup>r</sup>) (Invitrogen), *Bst*NI site was introduced at its 3'-terminus to further generate the CCA-3' sequence in the T7 transcript. Mutations aimed to change tRNA aminoacylation identity (Lys > Leu) were introduced by several steps of PCR-mutagenesis. Discriminator base A73—using oligonucleotides: tRK1-T7 GGGATCCATAATACGACTCACTATA GCCTT GTTGCCG, tRK1-A73-*Bst*NI GGGATCCTGGTGC CCTGTAGGGGGCTCG, tRK2-G1-T7 GGGATCCA TAATACGACTCACTATAGCCTTGTAGCTCAG, tRK2-C72A73-*Bst*NI GGGATCCTGGTGCCTCATAG GGGGCTCG. Anti-codon substitution was performed by Quick Change Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to manufacturer protocol. The following pairs of oligonucleotides were used ('As' for forward and 'Br' for reverse): tRK1UAAAs GACTTAA AATCATAAGG, tRK1UAABr TATGATTTTAAGTC ATACGC, tRK1CAAAAs GACTCAAATCATAAGG, tRK1CAABr TATGATTTTGAGTCATACGC, tRK2UAAAs GTTCGGCTTAAAACCG, tRK2UAABr CATTTCCGTTTTAAGCCG, tRK2CAAAAs GTTCGG CTCAAACCG, tRK2CAABr CATTTCCGTTTTG AGCCG, tRK3UAAAs GTCTTAAAAGCAACCC, tRK3UAABr GCTTTTAAGACAAC, tRK3CAAAAs CA GTTGCTCAAAGCAACCC, tRK3CAABr GGGTT GCTTTTGAGACAACTG.

For transient expression in MELAS cybrid cells, tRK1UAA/CAA, tRK2UAA/CAA, tRK3UAA/CAA genes were cloned in pBK-CMV (Kan<sup>r</sup>) vector (Stratagene) in *Bg*II/*Bam*HI (*Bg*III in the fragment and cohesive site *Bam*HI - in the vector) sites using oligonucleotides: TRK1/F1-Aviv GGCAAGATCTGGTCAGATTTCCA ATAACAGAATATCCTTGTAGCCTTGTGGCG, TRK1/F1-A73-Bviv GGCAAGATCTGTCATCGTGT TAAAAAAAAAAGAATGCCCTGTAGGGGGCT C, TRK2/F1-G1-Aviv GGCAAGATCTGGTCAGATTT CCAATAACAGAATATCCTTGTAGCCTTGTAG CTCAG, TRK2/F1-C72A73-Bviv GGCAAGATCTGTC ATCGTGTTTAAAAAAAAAAGAATGCCTCATA GGGGGCTCG, TRK3/F1-Aviv CCAAGAGATCTG GTCAGATTTCCAATAACAGAATAGAGAATATTG TTTAATG, TRK3/F1-Bviv CCAAGAGATCTGTCA TCGTGTTTAAAAAAAAAAGAATGAGAATAG CTGGAGTTG. tRNA genes were flanked by non-coding flanking regions of one of the well expressed tRK1 copies and were cloned in an opposite direction with respect to the CMV promoter in order to favour their transcription

from internal promoter by RNA polymerase III (RpoIII) and further correct maturation.

For stable transfection tRK1UAA/CAA, tRK2UAA/CAA genes were cloned in pKO.1 (Amp<sup>r</sup>) lentiviral vector (Addgene) (43) in *Age*I/*Eco*RI sites under the control of external U6-promoter without any flanking regions using oligonucleotides: trk1plkoAs GGCAACCGGTGC CTTGTTGGCG, trk1plkoBr GGCAGAATTCAAAAA TGCCCTGTAGGG, trk2plkoAs GGCAACCGGTGCC TTGTTAGCTCAG, trk2plkoBr GGCAGAATTCAAA AATGCCTCATAGGGGG.

### Purification of hmtLeuRS and *in vitro* aminoacylation assay

His-tagged hmtLeuRS and hmtLysRS were purified to homogeneity from BL21 CodonPlus (DE3)-RIL *Escherichia coli* strain through nickel affinity chromatography, followed by protein concentration through Nanosep 30 K (Pall) columns, and stored as 40% glycerol solution at -20°C. Activities of different enzyme fractions were tested on commercially available preparation of *E. coli* tRNA. Aminoacylation of tRNA T7-transcripts was done according to the described procedure (44). Final conditions were: 50 mM HEPES-NaOH (pH 7.6), 25 mM NaCl, 12 mM MgCl<sub>2</sub>, 2.5 mM ATP, 0.2 mg/ml BSA, 0.8 µM [<sup>3</sup>H]-Leu or 0.8 µM [<sup>3</sup>H]-Lys (>400 Ci/mmmole, NEC) and adapted concentrations of tRNA and enzyme. Aminoacylation rates and K<sub>m</sub> were measured as described elsewhere (45,46). Aminoacylation efficiencies of recombinant tRNA transcripts were compared to that of wild-type human mt-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> and mt-tRNA<sup>Lys</sup> T7-transcripts.

### Isolation and analysis of DNA

Total cellular DNA was isolated by standard procedures and the m.3243A>G mutation level was tested systematically by *Apa*I restriction analysis, as described elsewhere (47). Briefly, mutation containing mtDNA region was PCR-amplified using oligonucleotide primers: hp3081 G TAATCCAGGTCGGTTTCT and hp3380 CGTTCGGT AAGCATTAGG, PCR-products were digested by *Apa*I for 2 h and analyzed by gel-electrophoresis.

### Isolation and analysis of total and mitochondrial RNAs

Total and mitochondrial RNAs were isolated by standard TRIzol-extraction (Invitrogen) from cells and purified mitochondria, respectively. Mitochondria were isolated from cells as described previously, using the differential centrifugation protocol (48). RNA preparations were analyzed by Northern-hybridization with [<sup>32</sup>P]-5'-end-labelled oligonucleotide probes. To detect tRK1 versions we used oligonucleotide probe anti-tRK1 (1–34): GAGTC ATACGCGCTACCGATTGCGCCAACAAGGC, for tRK2 versions, the probe anti-tRK2 (2–32): GCCGAACG CTCTACCAACTCAGCTAACAAGG, for tRK3 versions, the probe anti-tRK3 (1–39): CTTAAAAGACAACTGTT TTACCATTAAACAAATATTCTC. The probes anti-mt-tRNA<sup>Leu</sup>: GAACCTCTGACTCTAAAG and anti-mt-tRNA<sup>Thr</sup>: CATCTCCGGTTTACAAG were used to control the quality of mitochondrial RNA. The probes anti-cy-tRNA<sup>Lys</sup>: CTTGAACCCTGGACC and

anti-cy-5.8SrRNA: AAGTGACGCTCAGACAGGCA to control the absence of contamination of mitochondrial RNA by cytosolic RNA.

#### Analysis of aminoacylation *in vivo*

Analysis of aminoacylation levels of recombinant tRNAs *in vivo* was performed through PAGE in acid conditions and subsequent Northern hybridization analysis as described elsewhere (49). Briefly, RNAs from cells were isolated with TRIzol-reagent (Invitrogen), precipitated on ice with 50% isopropanol and dissolved in 10 mM Sodium acetate pH4.5, 1 mM EDTA. Deacylated controls were prepared by 30 min incubation at 37°C in 0.25 M Tris-HCl pH8.5, 0.25 M MgCl<sub>2</sub> followed by RNA precipitation. RNAs in a loading buffer with 0.1 M Sodium acetate pH5.0 were run in a cold room through 35 cm long denaturing acid 6.5% PAAG with 0.1 M Sodium acetate pH5.0 and analyzed by Northern hybridization with [<sup>32</sup>P]-5'-end-labelled oligonucleotide probes.

#### Immunoblotting

For immunoblotting, whole cells were solubilized in a Laemmli's buffer (50) in the way to have SDS: protein ratio ~25–30 (w/w), sonicated for 5 s to break cellular DNA; incubated for 10 min at 60°C, and 30 µg of protein were run on a 12.5% SDS-PAGE, and subsequently transferred to a nitrocellulose membrane. When several cell lines were compared, we either used the same filter cut at the levels of different proteins of interest or separate runs of equal aliquots of the same protein extract with simultaneous electrotransfer, to ensure the comparability of the results. In all cases the amount of analyzed proteins was in the linear area of signal detection, as verified by in-gel titration with following scanning in the Typhoon-Trio. In no case the signal was saturated in the experiments presented. For immunodetection following antibodies were used: polyclonal antibodies against COX2, ND1 and commercially available monoclonal antibodies against porin (Calbiochem 529538), α-tubulin (Sigma T6074). Detection was done either using ECL<sup>TM</sup> horseradish peroxidase linked secondary antibodies and 'ECL Plus Western Blotting Detection Reagent', or using ECL Plex<sup>TM</sup> Cy3 and Cy5-conjugated secondary antibodies, on Typhoon-Trio (all from GE Healthcare). Signal quantification was performed in ImageQuantTL programme from the same manufacturer.

#### *In vivo* mitochondrial translation

The analysis of mitochondrial protein synthesis was performed as previously described (39) with minor modifications. Briefly, 600 × 10<sup>3</sup> cells were incubated for 10 min in DMEM w/o methionine (Sigma) in the presence of 100 µg/ml of emetine to inhibit cytoplasmic translation, followed by 30 min with 200 µCi/ml [<sup>35</sup>S]-methionine (>1000 Ci/mmol, GE Healthcare), and, finally, 10 min chase in the normal growth medium. Cells were solubilized in a Laemmli's buffer (50), sonicated for 5 s to fragmentize chromosomal DNA; incubated for 10 min at 37°C, and 100 µg of protein were run on a 10–20% gradient SDS-PAGE. Protein amounts loaded were before normalized

by anti-porin immunoblotting of the same preparations. Visualization and quantification were performed using Typhoon-Trio and ImageQuantTL software from GE Healthcare.

#### Measurement of oxygen consumption

The rates of oxygen consumption were measured using Hansatech Oxygraph. Respiration of intact (non-permeabilized) cells was measured using 1–2 × 10<sup>6</sup> cells/ml in PBS in the presence of 5 mM glucose. A 1 µg/ml of oligomycin, FCCP in the range of 10–500 nM and 1 mM of KCN were sequentially added to measure coupled, uncoupled and non-mitochondrial oxygen consumption, respectively.

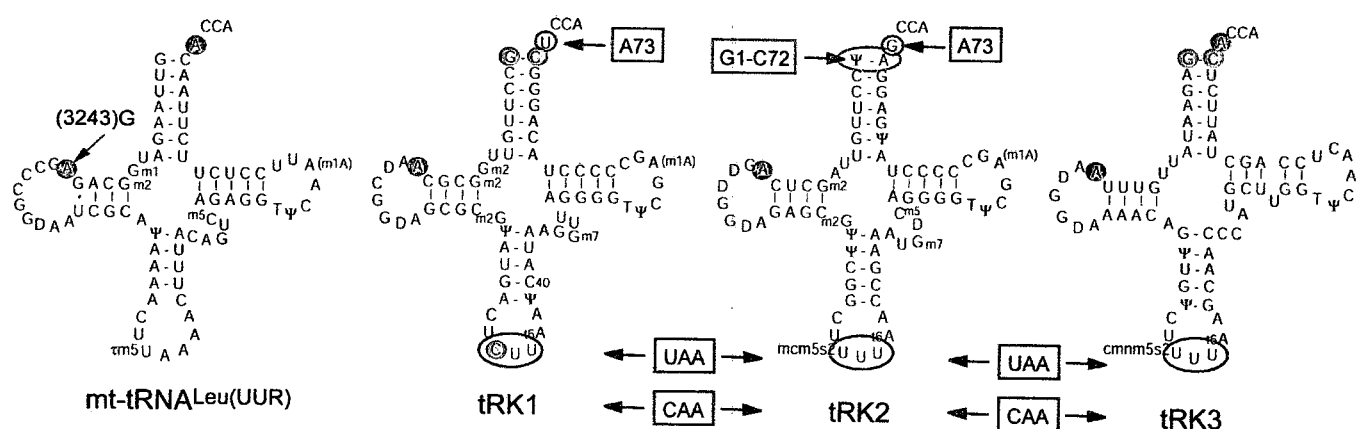
The rates of substrate dependent oxygen consumption were measured on 1–2 × 10<sup>6</sup> cells/ml in a respiration buffer containing 20 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 200 mM sucrose, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 mM EGTA and 1 g/l of BSA. Cells were permeabilized by digitonin [100 µg of digitonin per 1 mg of total cell protein (~1 × 10<sup>6</sup> cells)]. Succinate was used to donate electrons at Complex II level, while Complex I was inhibited by 0.5 µM rotenone. Ascorbate was used to donate electrons at Complex IV level, while both Complex I and Complex II (by 5 mM malonic acid) were inhibited. Maximal possible respiration rates were measured in the presence of the uncoupler FCCP (50–500 nM) and oligomycin (1 µg/ml). Non-mitochondrial oxygen consumption was measured at the end of each experiment upon addition of 1 mM KCN.

## RESULTS

### Construction of importable tRNAs with leucine aminoacylation identity

The major identity elements required for recognition of tRNA<sup>Leu(UUR)</sup> by mitochondrial LeuRS are 'discriminator' base A73 and the A14 base (affected by m.3243A>G mutation) (Figure 1) (44,45). Among yeast tRNA derivatives mitochondrially importable *in vivo* in human cells we have previously characterized three lysine isoacceptor tRNAs (tRKs). Two of them are cytosolic type tRNAs: wild-type tRK1 and recombinant tRK2 (G1-C72; G73; U34). The third—a mitochondrial-type : tRK3, which can be nuclearly expressed and then targeted into mitochondria (Figure 1) (39). We introduced in these three tRNAs the discriminator base A73 and leucine anticodons, either UAA or CAA. The first one with the expectation that the U in the wobble position would be correctly modified, the last one with the purpose to decode UUG codons even if the anticodon will be not modified. Therefore, six different versions of potentially therapeutic tRNAs: tRK1UAA, tRK1CAA, tRK2UAA, tRK2CAA, tRK3UAA and tRK3CAA were designed and further used for *in vitro* and *in vivo* assays (Figure 1). All these versions were compared for their capacity to be aminoacylated by recombinant human mitochondrial leucyl-tRNA- and lysyl-tRNA synthetases (Table 1). As expected, all versions gained the capacity to be leucinylated with efficiencies comparable with that of human mt-





**Figure 1.** Cloverleaf structures of tRNAs used in this study. From left to right: native human mitochondrial tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>, major identity elements of recognition by mtLeuRS are in blue filled circles and MELAS m.3243A>G mutation is indicated by the red arrow; three yeast lysine tRNAs, tRK1, tRK2; tRK3 and their recombinant versions, tRK1UAA/CAA, tRK2UAA/CAA, tRK3UAA/CAA, with determinants of mitochondrial import indicated in green filled circles, identity elements for human mtLeuRS are in blue filled circles, mutations and regions where they were introduced are indicated by arrows and enclosed in blue for leucine aminoacylation identity elements, in green—for import determinants and in red—for leucine anticodons. Post-transcriptional modifications: 5-taurinomethyluridine (tm<sup>5</sup>U), 5-methylcarboxymethyl-2-thiouridine (m<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U), 5-carboxymethylaminomethyl-2-thiouridine (cmnm<sup>5</sup>s<sup>2</sup>U), 1-methylguanosine (m<sup>1</sup>G), 2-methylguanosine (m<sup>2</sup>G), 7-methylguanosine (m<sup>7</sup>G), 1-methyladenosine (m<sup>1</sup>A), 5-methylcytidine (m<sup>5</sup>C), pseudouridine (ψ), dihydrouridine (D), 5-methyluridine (T) and N6-threonylcarbamoyladenine (t<sup>6</sup>A).

tRNA<sup>Leu</sup> (the tRK2CAA version having a lowest efficiency, but still at the level of 37% in comparison with the cognate tRNA). On the other hand, we observed that most of the version also retained a low capacity to be lysinylated. The best version from the point of view of aminoacylation properties was tRK1CAA, which was as well leucinylated as the cognate mt-tRNA<sup>Leu</sup> and retained a lowest lysinylation capacity (6% of mt-tRNA<sup>Lys</sup>).

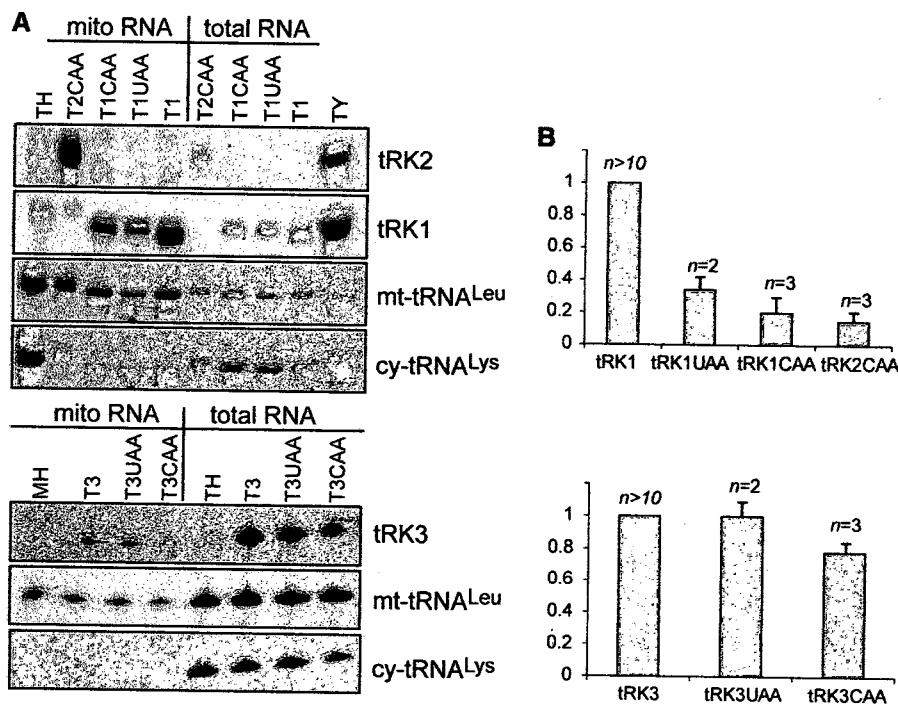
We tested then whether new recombinant tRNAs preserved their ability to be imported into mitochondria of human cells. To this end, MELAS cybrid cells were transfected with corresponding T7-transcripts, total and mitochondrial RNAs from cells were isolated 24 h after transfection and analyzed by Northern hybridization with <sup>32</sup>P-5'-end labelled oligonucleotide probes (Figure 2A). The import capacity of different recombinant tRNAs was evaluated as a ratio of the hybridization signal corresponding to the recombinant RNA in purified mitochondrial RNA fraction to that of human mt-tRNA<sup>Leu</sup> in the same isolate. It was then expressed as relative value in comparison with the import of tRK1 or tRK3 transcripts taken as 1.0 in each series. All synthetic tRNAs tested were found to be imported into mitochondria of MELAS cybrid cells *in vivo* with various efficiencies (Figure 2B). Mutations introduced in the anti-codon region of tRK3UAA (U35:A35, U36:A36) and tRK3CAA (U34:C34, U35:A35, U36:A36) did not significantly reduce efficiency of their import, while substitutions made in tRK1UUA (U73:A73, C34:U34, U35:A35, U36:A36) and tRK1CAA (U73:A73, U35:A35, U36:A36) decreased their import 3- and 5-fold, respectively, compared to tRK1 without mutations. Import efficiency of tRK2CAA was estimated comparing to tRK1 transcript, since wild-type tRK2 is not imported into mitochondria (42,51–53), and its import was approximately seven times lower when compared to tRK1.

**Table 1.** Aminoacylation of tRK mutant versions by recombinant human mitochondrial LeuRS et LysRS

tRNA	Km (μM)	V (pmoles × 10 <sup>-3</sup> /min)	V/Km	Relative efficiency of aminoacylation (%)
<b>LysRS</b>				
mt-tRNA <sup>Lys</sup>	1	50	50.0	100
tRK3	0.3	25	83.3	167
tRK2CAA	0.9	27.5	30.6	61
tRK2UAA	2.2	50	22.7	45
tRK3CAA	3.7	21	5.7	11
tRK3UAA	8	75	9.4	19
tRK1CAA	4.2	12.5	3.0	6
tRK1UAA	1.9	31	16.4	33
<b>LeuRS</b>				
mt-tRNA <sup>Leu</sup>	0.5	62.5	125.0	100
tRK2CAA	0.8	37	46.3	37
tRK2UAA	0.6	80	133.3	107
tRK3CAA	0.65	59	90.8	73
tRK3UAA	0.6	60	100.0	80
tRK1CAA	0.7	81	115.5	93
tRK1UAA	0.55	58	105.5	84

T7-transcripts were used as substrates. The mean values presented are the result of several ( $n > 3$ ) independent measures with the error <10%.

Using the same approach, we found that T7-transcripts were stable in transfected cells at least 48 h after transfection. Despite efficient targeting into mitochondria of all synthetic recombinant tRNAs, we were not able to observe any effect on mitochondrial translation (data not shown). Moreover, the analysis of aminoacylation state of these transcripts using the acid gel method (49) showed that they were mostly present in deacylated form, a finding which could be explained by the absence of posttranscriptional modifications in T7-transcripts. To overcome this problem, the experiments were axed at *in vivo* expression of the recombinant tRNAs.



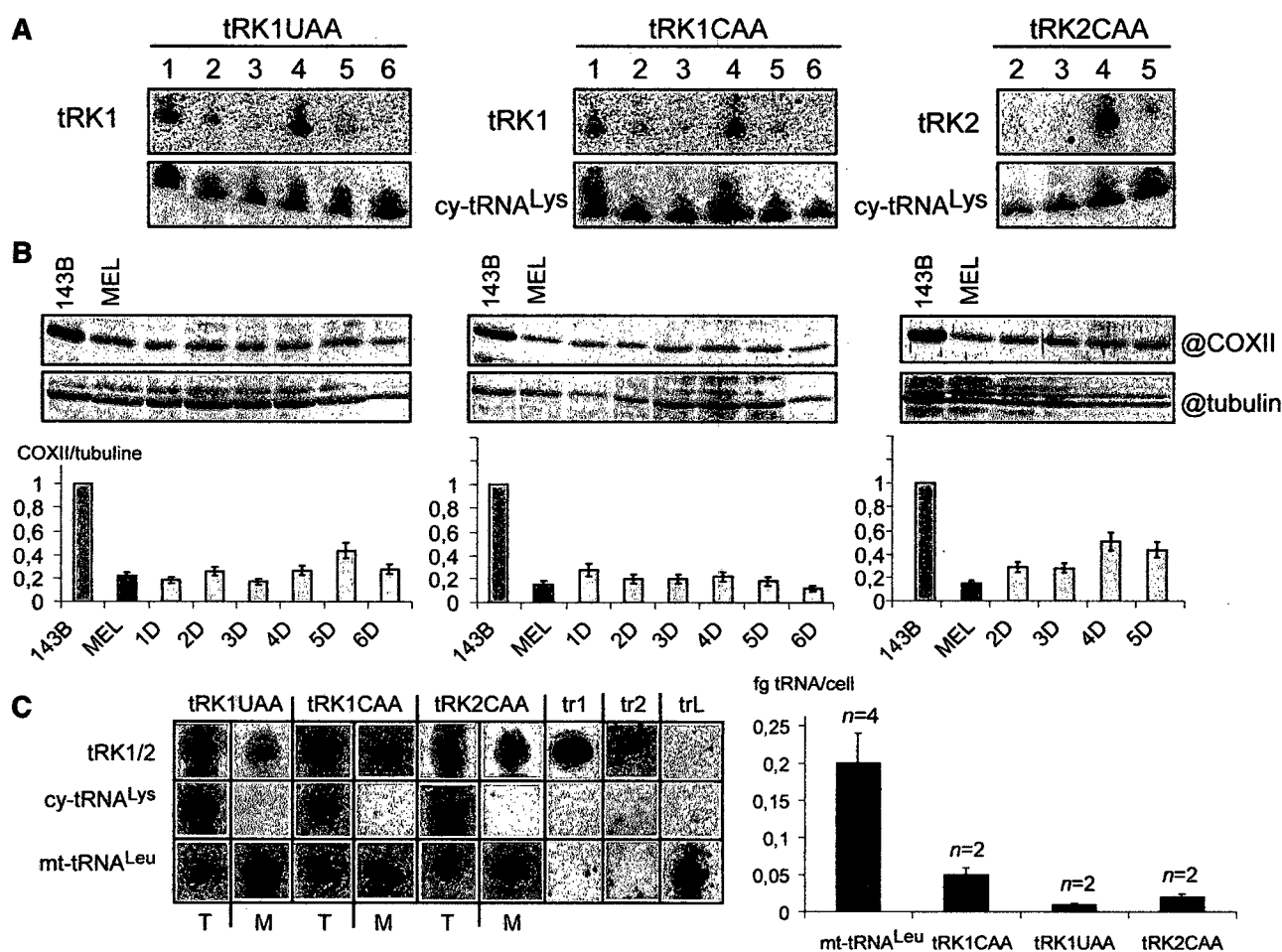
**Figure 2.** Analysis of *in vivo* import of synthetic recombinant tRNAs in mitochondria of MELAS cybrid cells. (A) Northern hybridization of total and mitochondrial RNA isolated from MELAS cybrid cells transfected with T7-transcripts. Specific [ $^{32}$ P]-oligonucleotide probes to tRK1, tRK2 and tRK3 were used to check for mitochondrial import, mt-tRNA-Leu probe—to control the absence of degradation of mitochondrial tRNAs and cy-tRNA-Lys probe to control the absence of its contamination by cytosolic tRNAs (the probes are indicated at the right of the panels). Minor bands visible with tRK1 probe in tRK2-transfectants and with cy-tRNA-Lys probe in tRK1 and tRK2 ones represent the unwashed traces of previous hybridizations of the same membrane and are unspecific (they do not migrate as the cognate tRNAs and therefore do not alter any interpretation of the specific signals). TH and MH are total and mitochondrial RNAs from non-transfected MELAS cells, TY stands for total yeast RNA used as the control of hybridization specificity. T1 and T3 are the transcripts of yeast tRK1 and tRK3 without mutations used to estimate the import efficiency of recombinant tRNAs (B) Relative amount of imported recombinant tRNAs calculated as a ratio of hybridization signals for recombinant tRNAs in mitochondrial RNA fraction to that of mt-tRNA<sup>Leu</sup> in the same preparation. The import efficiencies presented on the graph represent relative values in comparison to these of tRK1 or tRK3 taken as 1.0 in each series. The presented error bars are issued from several independent experiments, as indicated above the diagrams.

### Analysis of transient expression of recombinant tRNAs in MELAS cybrid cells

In order to express functional recombinant tRNAs in cybrid cells, we performed transfection with DNA constructs containing corresponding mutated genes. To this end, we first used mammalian expression vector pBK-CMV and cloned recombinant tRNA genes in an opposite direction with respect to the CMV promoter in order to favour their transcription from their internal promoter for RNA polymerase III (RpoIII) and their further correct maturation. MELAS cybrid cells were transiently transfected with pBK-CMV-tRK plasmids with the efficiency close to 90% (as revealed by FACS analysis of the transfection control with a GFP-expressing plasmid). Total cellular RNA was then analyzed by Northern hybridization 24 h, 48 h and 72 h after transfection to check expression and stability of recombinant tRNAs. tRK1 and tRK2-based versions were stable for 24 h, while their amount strongly decreased at day 2 (Figure 3A). Expression of tRK3 versions was not detected, which can be explained by non-optimal sequence of internal promoter for RpoIII in these transgenes as compared to tRK1/tRK2 versions. In order to increase the period during which transgenic tRNAs are present in transfected

cells, we performed successive transfections, with a second transfection on the 3rd day after the first one. MELAS cybrid cell line used has defective steady-state level of the mtDNA-encoded COX2 subunit and decreased cytochrome *c* oxidase (COX) enzymatic activity, which is in agreement with previously published data (40). We analyzed steady-state level of COX2 protein during 6 days after transfection by immunoblotting of total cell protein extracts (Figure 3B). For several tRNA versions, reproducible increase of COX2 was observed with the most pronounced effect detected after transfection with tRK2CAA, where COX2 level was increased approximately three times as compared to non-transfected cybrid cells with its maximum being at the fourth day (1 day after the second transfection). tRK1UAA version also caused a two-fold increase of COX2 on the fifth day (2 days after second transfection), while tRK1CAA induced only a slight increase (1.5 times) 1 day after first transfection. The increase of COX2 level was however temporary in all assays, which is in agreement with the transient presence of recombinant RNAs in transfected cells.

The presence of recombinant tRNA versions in mitochondria of transfected cells was checked by Northern hybridisation (Figure 3C, left panel). All three



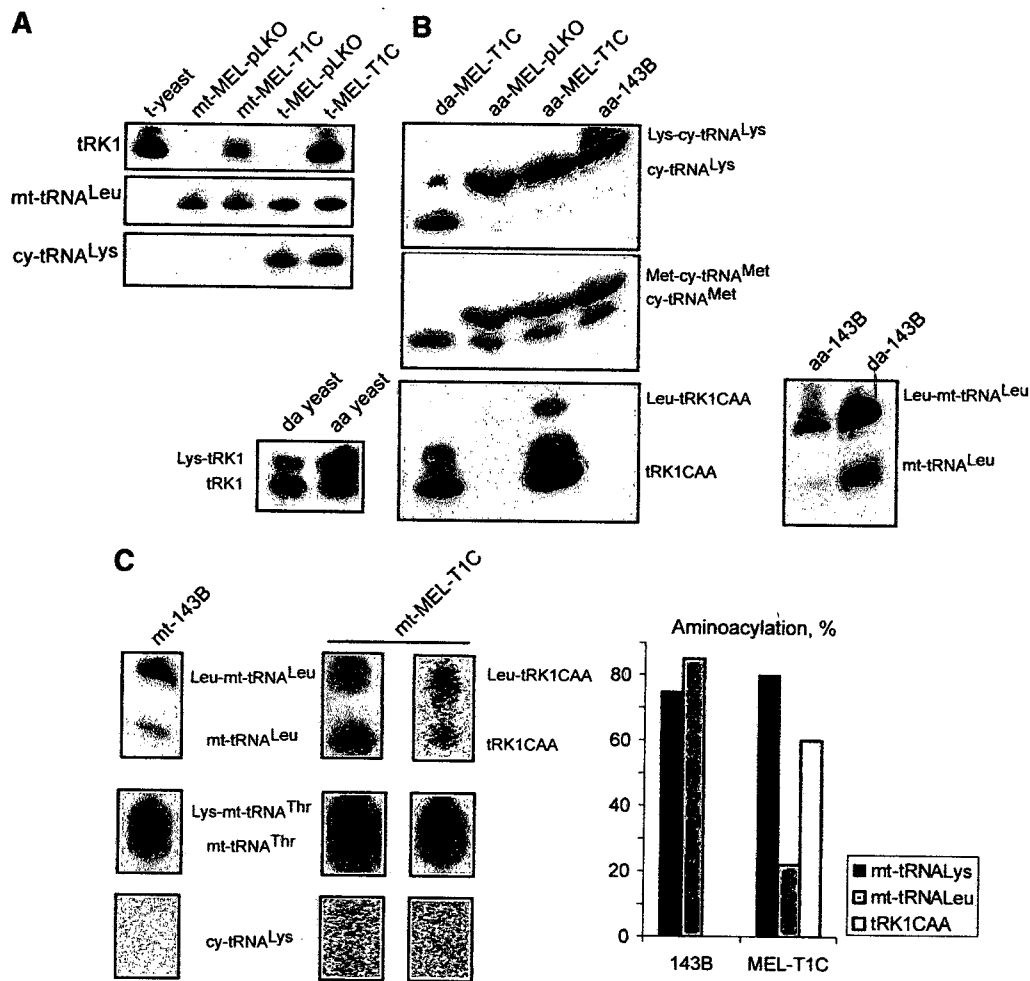
**Figure 3.** Effect of transient expression of recombinant tRNAs on COXII level in MELAS cybrid cells. (A) Northern hybridization analysis of total RNAs isolated from pBK-CMV-tRK transfected MELAS cybrid cells. Cells were transfected twice, second transfection was performed on the third day after the first one, and RNAs were isolated 1–6 days after the first transfection. Specific [<sup>32</sup>P]-oligonucleotide probes are indicated on the left of the autoradiographs (tRK1, tRK2 or cy-tRNA<sup>Lys</sup>—for the control cytoplasmic tRNA<sup>Lys</sup> used as the quantification reference). (B) Western analysis of protein extracts from the transfected cells with anti-COX2 antibodies. Anti-tubulin antibodies were used as the quantification reference. Two different MW zones of the same blot were analyzed for COX2 and tubulin. The steady-state levels of COX2 before and after transfection, normalized to tubulin, are shown as diagrams for each tRNA-version in the lower panel of the figure. Values are presented relative to COX2 level in 143B parental cells, taken as 1. Error bars correspond to the results of 3–5 independent assays. (C) Northern hybridization of total (T) and mitochondrial (M) RNA isolated from MELAS cybrid cells 24 h after transient transfection with recombinant tRNAs. Hybridisation probes are indicated at the left. Transfected RNAs (tRK1UAA; tRK1CAA, tRK2CAA) and quantitative controls (2 ng of T7-transcripts of tRK1, tr1, tRK2, tr2 and mt-tRNA<sup>Leu</sup>, trL) are indicated at the top. The diagram at the right is a result of at least two independent experiments, as indicated.

recombinant versions were present in mitochondria which did not contain any detectable cytosolic contamination. tRK1 versions were analysed along with T7 transcripts of tRK1, tRK2 and mt-tRNA<sup>Leu</sup>, which permitted quantification of the import (Figure 3C, right panel). The amount of all three versions was significantly lower than that of the reference host mt-tRNA<sup>Leu</sup>, which can explain the limited effect of their expression on COX2 level, so far this recovery effect was observed in all the cases in a reproducible manner.

#### Generation of MELAS cybrid cells stably expressing leucine recombinant tRNA genes

In an attempt to stabilize the curative effect of mitochondrial import of recombinant tRNAs, we used the lentiviral transfection system. tRNA genes were cloned in the vector

pLKO.1 under the control of an external U6 RpoIII promoter. Before infection, pLKO.1-tRK constructs were first verified in the transient transfection system, in which expression of tRK1UAA/CAA and tRK2UAA/CAA was observed. For stable lentiviral transfection, MELAS cybrid cells were analyzed 72 h or 96 h after infection for transgene expression, and tRK1CAA was found to be the only one stably and efficiently expressed (Figure 4A). Other constructs, giving no sufficient levels of expression (although the presence of the transgene was confirmed by PCR) were not analyzed further. The MELAS-pLKO.1-tRK1CAA cell line was therefore analyzed in depth. Furthermore, this very version proved to be the most prospective one, taking into account its best aminoacylation properties (Table 1) and import capacity comparable with other versions.



**Figure 4.** Import and aminoacylation of tRK1CAA stably expressed in MELAS cells. (A) Northern hybridization of total (t) and mitochondrial RNA (mt) from MEL-pLKO.1-T1CAA (MEL-T1C), MEL-pLKO.1 (MEL-pLKO) human cells and yeast with tRK1 and cy-tRNA<sup>Lys</sup>-specific [<sup>32</sup>P]-labelled oligonucleotide probes. (B) Acid gel and northern analysis of total RNAs isolated from MEL-T1C, MEL-pLKO, 143B human cells and yeast with tRK1, mt-tRNA<sup>Leu</sup>, cy-tRNA<sup>Lys</sup> and cy-tRNA<sup>Met</sup>-specific [<sup>32</sup>P]-labelled oligonucleotide probes (aa, aminoacylated RNA; da, RNA partially deacylated in basic conditions before loading). (C) Acid gel and northern analysis of mitochondrial RNA isolated from parental 143B and MEL-T1C cells. Aminoacylated and deacylated forms of mt-tRNA<sup>Leu</sup>, mt-tRNA<sup>Thr</sup> and tRK1CAA are indicated. The diagram at the right shows the quantification of aminoacylation levels for all these tRNAs (tRK1CAA was not analysed in the parental line since this RNA is absent therein).

By Northern hybridization analysis of purified mitochondrial RNA, we have shown that fraction of tRK1CAA was imported into mitochondria of MELAS-pLKO.1-tRK1CAA cells (Figure 4A), which confirmed our results obtained with T7-transcripts. RNA acid gel analysis demonstrated that at least a part of recombinant tRK1CAA in MELAS cells was aminoacylated (Figure 4B). Comparing the distance between aminoacylated and not aminoacylated forms of tRK1CAA and of other cellular tRNAs, we concluded, that the upper band corresponded to tRK1CAA aminoacylated with leucine. The middle band could correspond to tRK1CAA aminoacylated with lysine, so far, taking into account its low lysinylation level *in vitro* (Table 1) and the fact that the same band is detectable in both native and deacylated preparations, we suggest rather a non-specific signal. Furthermore, a possible unspecific aminoacylation is most likely done by cytoplasmic LysRS rather than by its mitochondrial counterpart taken into account that in

mitochondria the amount of tRK1CAA is lower and mitochondrial LeuRS is present as a competitor. Therefore we hope that the minor portion of tRK1CAA possibly charged with lysine, if any, would have no considerable effects either on mitochondrial translation, or on cytosolic protein synthesis. Since leucine identity elements for human mitochondrial LeuRS we introduced in tRK1CAA were distinct from those for cytosolic LeuRS (44), and taking into account the possibility to leucinylate the recombinant tRNA *in vitro*, we conclude that tRK1CAA was aminoacylated with the leucine by mitochondrial LeuRS after its mitochondrial import. The portion of leucinylated tRK1CAA is modest probably because of non-optimal aminoacylation efficiency of recombinant tRNAs *in vivo*, but also because of naturally low amounts of tRNAs imported into mitochondria.

The above conclusions were verified by measuring the extent of tRK1CAA leucinylation in mitochondrial RNA preparations (Figure 4C). We compared the stable

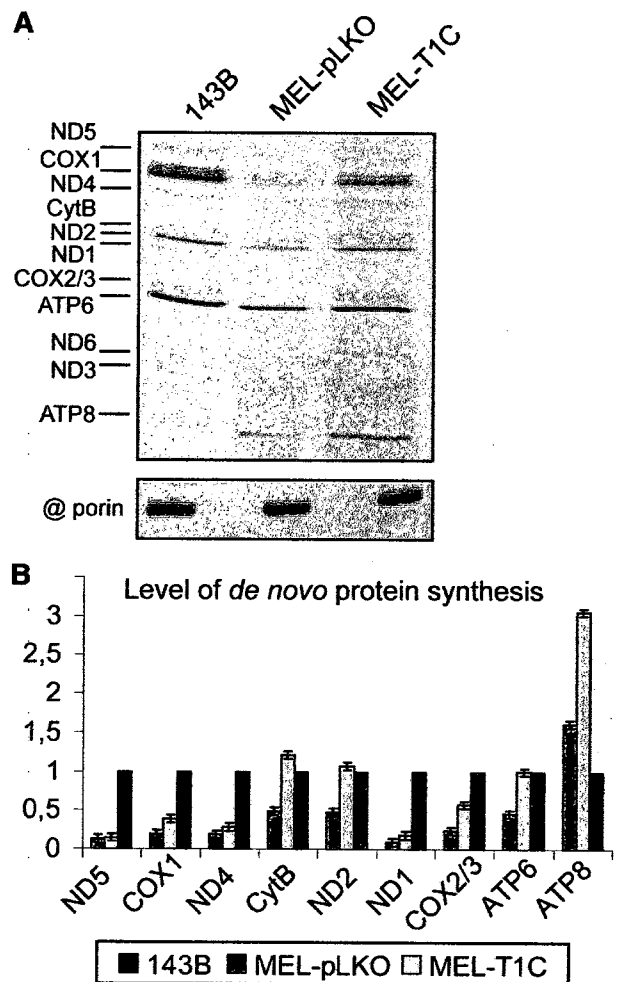
tRK1CAA expressor with the MELAS cybrid line and observed, as expected, a very low aminoacylation level for the host mt-tRNA<sup>Leu</sup> affected by the mutation (10–20%). At the same time the overall level of tRNA aminoacylation (as judged by the reference mt-tRNA<sup>Thr</sup>) was high (>70%). The recombinant tRK1CAA was found partially aminoacylated (50–60%), which is significantly more pronounced than in the total RNA. This result is in agreement with the speculations above, and is likely to be explained by the efficient aminoacylation by the LeuRS in the mitochondria, while the major portion of deacylated tRK1CAA resides in the cytosol of the transfectant. Therefore, one can consider that if the level of import may be low (if comparable with the transient expression experiment), the aminoacylation by the mitochondrial enzyme was rather efficient and therefore one could expect to detect the curative effect.

#### Improvement of mitochondrial functions in MELAS-pLKO.1-tRK1CAA cells

In agreement with previous reports (11,21), the original MELAS cybrid cells showed strongly decreased mitochondrial protein synthesis, with large polypeptides ND2, COX1, COX2 and COX3 being particularly affected, but the qualitative pattern of mitochondrial translation products was unchanged. In MELAS-pLKO.1-tRK1CAA cells amounts of mitochondrial translation products were found to be increased to 30–50% in a generalized manner, compared to control cells transfected with an empty vector (MELAS-pLKO.1) (Figure 5). Further western analysis of mitochondrial DNA-encoded respiratory subunits revealed a reproducible increase of COX2 (+22%) and ND1 (+10%) proteins in MELAS cells stably expressing tRK1CAA transgene (Figure 6).

Oxygen consumption levels in MELAS-pLKO.1-tRK1CAA and MELAS cells transfected with the empty plasmid were then compared (Figure 7A and B). The reference MELAS-pLKO.1 cells demonstrated strongly decreased respiration with the ratio of uncoupled to coupled respiration (respiratory control) approximately two times lower than for 143B cells, which was in agreement with previously reported data (19). In MELAS-pLKO.1-tRK1CAA cells the rates of coupled and uncoupled oxygen consumption were increased about two times in comparison with the respective rates in MELAS-pLKO.1 cells, while respiration control was also improved.

To decipher this positive effect on cellular respiration, substrate-dependent oxygen consumption on digitonin permeabilized cells was analyzed. MELAS and 143B cells revealed similar succinate-supported respiration rates through complex II entirely encoded by nuclear DNA (Figure 7C). This succinate-supported respiration was not affected by tRK1CAA expression, as expected. In contrast, there was a substantial decrease in respiration rate through complex IV in MELAS-pLKO.1 cells comparing to 143B cells (Figure 7D). Importantly, this ascorbate-supported respiration was strongly increased in the MELAS cells with tRK1CAA, which confirmed previously observed rise of COX2 steady-state



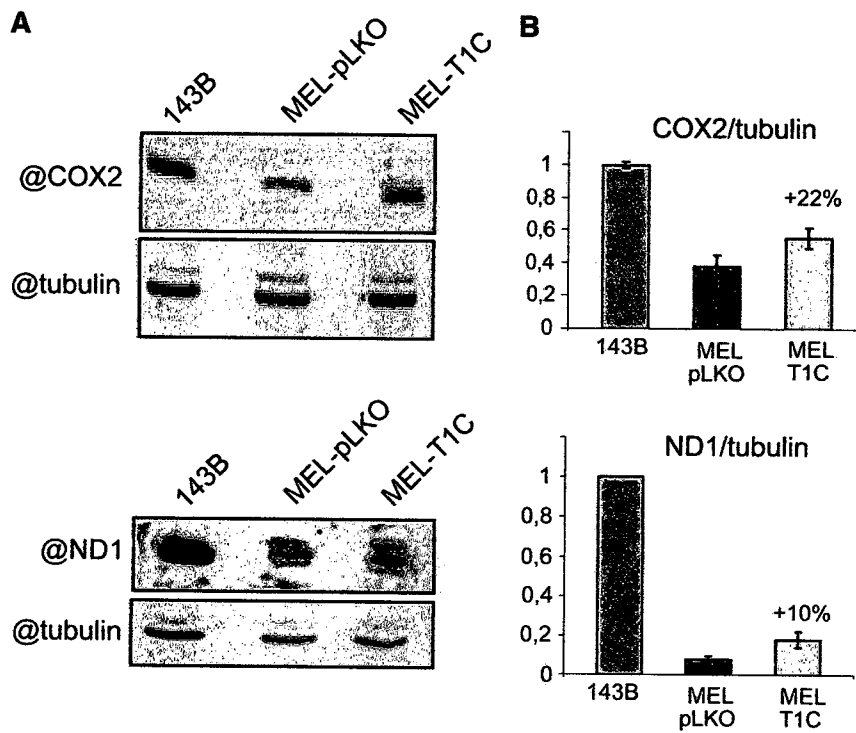
**Figure 5.** Mitochondrial translation in MELAS-pLKO-tRK1CAA cybrid cells. (A) Pulse-chase analysis of mitochondrial translation. Radioautograph of [<sup>35</sup>S]-labelled mitochondrial translation products separated by SDS-PAGE is presented. The lines used are indicated at the top: 143B, MEL-pLKO and MEL-T1C. The bands corresponding to individual translation products are indicated according to standard pattern (56). Equal amounts of proteins were loaded in each case, which was controlled by Western analysis of porin in the same samples performed in parallel (below the main panel). (B) The diagram shows the levels of individual translation products in each cell line relative to those in 143B cells (taken as 1).

level and general improvement of mitochondrial translation.

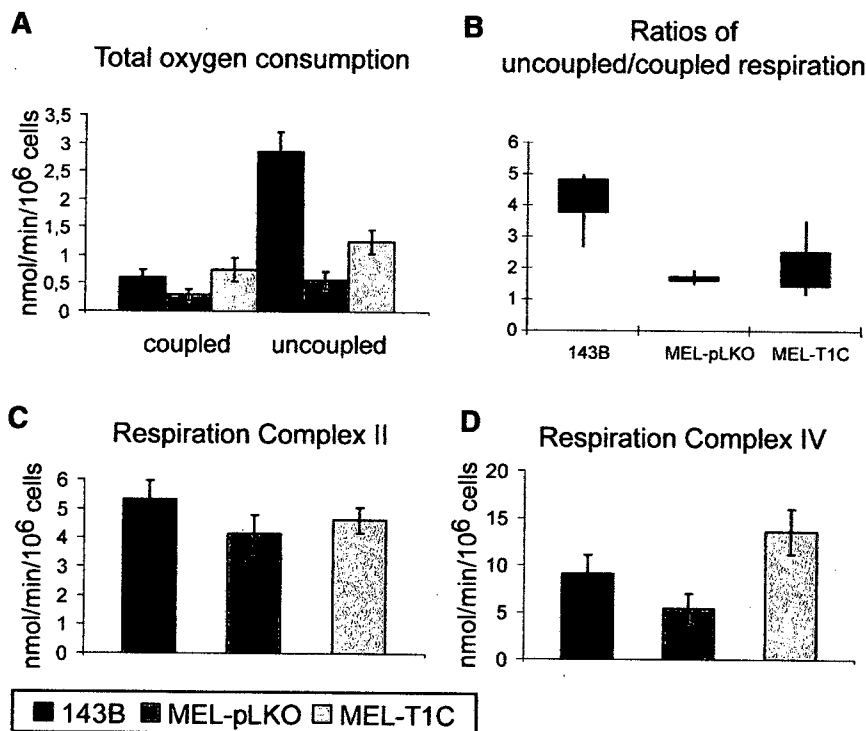
Since the high heteroplasmy level in MELAS-pLKO.1-tRK1CAA was unchanged upon transfection (~90%), one can conclude that the observed functional improvement of mitochondrial functions was due to expression and mitochondrial import of the recombinant tRNA.

#### DISCUSSION

The results of this study clearly demonstrate that one can alter aminoacylation identity of a tRNA preserving its ability to be imported *in vivo* into human mitochondria and to participate in the organellar translation. Indeed, we



**Figure 6.** Steady-state level of mitochondrial proteins in MELAS-pLKO-tRK1CAA cybrid cells. (A) Western analysis of protein extracts from 143B, MEL-pLKO and MEL-T1C cell lines with antibodies against mitochondrial proteins COX2, ND1 and tubulin. (B) COX2 and ND1 steady-state levels in each cell line, normalized to tubulin and relative to the steady-state level of the corresponding protein in parental 143B cells (taken as 1).



**Figure 7.** Oxygen consumption in MELAS-pLKO-tRK1CAA cybrid cells. (A) The rates of coupled and uncoupled oxygen consumption (the mean values  $\pm$  SD,  $n = 3$ ) in 143B, MEL-pLKO and MEL-T1C cell lines in  $\text{nmol O}_2/10^6 \text{ cell} \cdot \text{min}$ . (B) Box and whisker plots (57) represent the ratios of uncoupled to coupled respiration rates in 143B, MEL-pLKO and MEL-T1C cell lines. The overall data range is represented as a vertical line, while boxes represent the interquartile range containing central 50% data. (C) The rates of the respiration on succinate in permeabilized 143B, MEL-pLKO and MEL-T1C cells. (D) The rates of the respiration on ascorbate in permeabilized 143B, MEL-pLKO and MEL-T1C cells.

show that nuclear expression and subsequent mitochondrial import of specifically designed tRNAs of yeast origin with artificially changed identity (cytoplasmic lysine to mitochondrial leucine) partially rescues various negative effects of the mutation m.3243A>G in the mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup> gene underlying the MELAS syndrome in cultured human cells. This rescue was observed at the levels of mitochondrial translation, steady state of mitochondrial DNA-encoded subunits of the respiratory chain and cellular respiration.

The increase of COX2 steady-state level that we observed in MELAS cells in transient transfection system varied in strength and duration depending on tRNA version expressed (Figure 3). This could indicate on possible differences in behaviour and action of different recombinant tRNAs in the cell. Thus, lower import efficiency of tRK1CAA comparing to tRK1UAA (Figure 2) can partially explain its moderate effect on COX2 level. On the other hand, the less efficient import substrate tRK2CAA lead to the best improvement of COX2 level, probably taking advantage of its CAA anti-codon, which did not need post-transcriptional modification to decode leucine UUG codons. This experimental fact is in frame of a suggestion that the MELAS mutation might affect essentially decoding UUG, but not UUA. On the other hand, it is to be outlined that the improvement of mitochondrial function depended not only on the efficiency of a particular tRNA to participate in mitochondrial translation, but also on the time it was present in cell. For example, the effect of tRK1CAA on COX2 steady-state level was more pronounced once it has been expressed in cybrid cells in a stable manner. The importance of the effect depends on a multitude of linked or non-linked factors influencing each step of the experiment: efficiency of transfection, efficiency of expression of the tRNA gene, efficiency of import, mitochondrial activity state that may vary significantly even in continuously cultivated line, modification and aminoacylation of the transgenic tRNAs, the stability of the given transgenic tRNA in the cell and in the mitochondria, misaminoacylation of the tRNA, which can give negative effects on mitochondrial or cytoplasmic translation, etc. On the other hand, if the efficiency of different versions varies, all of them provided a detectable and reproducible curative effect, thus validating the strategy, whose efficiency certainly needs to be improved to make it applicable in therapy.

Meanwhile, MELAS-pLKO.1-tRK1CAA cells clearly demonstrated a significant rescue of mitochondrial functions at all levels analyzed (Figures 5–7). Thus, synthesis of certain polypeptides reached or even exceeded (for ND2, CytB and ATP6) its level in 143B wild type cells, while synthesis of others was improved up to 30% (for COX1)—50% (for COX2/3) of its wild-type level, indicating that tRK1CAA participated in mitochondrial translation. However, no clear correlation between number of leucine codons (neither UUG, nor UUR) and translation level of particular mitochondrial proteins was observed in MELAS cybrid cell before or after transfection, which is corroborated by previously reported data (11,21). The partial nature of the effect could be explained

by insufficient level of expression of the recombinant tRNA gene(s), defective post-transcriptional modifications of recombinant tRNAs, ineffective export of tRNAs from nucleus and targeting into mitochondria or, finally, low efficiency of re-aminoacylation inside the organelle. Furthermore, one could also imagine that the growth conditions used (high glucose and pyruvate) do not favour the switch from glycolysis to oxidative phosphorylation in transfected cybrid cells energy production. In any case, the observed increase of mitochondrial translation level and subsequent augmentation of COX2 and ND1 steady states was sufficient to improve the rate of oxygen consumption in MELAS-pLKO.1-tRK1CAA cells about 2-fold. Such an increase may prove to be sufficient for further therapeutic application. The question that might emerge, is the validity of the strategy described here for various cell/tissue types. The efficiency of the approach relies to the RNA import mechanism, which is far to be understood in details. Indeed, our studies of the human RNA import (both natural, for 5S rRNA, and artificial, for tRNA derivatives) indicate on the importance of the membrane charge and ATP hydrolysis for import (31,54). It was reported that isolated and discharged mitochondria from cybrid cells bearing a pathogenic mutation fail to incorporate tRNAs (33). So far, these data are in contradiction with our previously published report of the *in vivo* import of tRNA<sup>Lys</sup> derivatives which, in spite of the lower energized state of mitochondria in MERRF cybrids can import tRNAs enough to complement mitochondrial deficiency (39). So, we believe that, since no mtDNA mutation described led to a complete discharging of the mitochondrial membrane potential, one could expect the possibility to target RNAs into mitochondria. As a confirmation of our former study, the results obtained in the current work show that in the strongly affected cybrid cell line tRNA import may be achieved and the phenotypic effect is measurable, if even the cells were affected by another mutation (MELAS versus MERRF) and the phenotypic alteration caused by the mutation were different. On the other hand, it is evident that the efficiency of the approach will not only depend on the efficiency of import *per se*, but also on the amount of the 'therapeutic' RNA in a given type of cell, which will depend on the delivery procedure, as well as on the functionality of the tRNA itself, in terms of aminoacylation and decoding properties.

In conclusion, the recombinant leucine tRNAs validated in the present work could be tested in modelling therapeutic approaches to a number of other disorders caused by dysfunction of mt-tRNA<sup>Leu(UUR)</sup>. As an important issue of the study, it clearly appears that the mitochondrial translation system in human cells possesses a significant extent of flexibility, accepting not only cytosolic-type tRNAs, but also tRNAs of yeast origin, which are evolutionary very distinct from the human ones. This makes us believe that the strategy developed in this study can be applied to all tRNA mutations which are not affecting the overall expression of mtDNA, however for each case the importable and functionally active molecule must be designed. Construction of these new importable versions may be helped by a



comprehensive view of the mechanisms governing the selectivity of tRNA import, taking into account the identified import determinants (42,51,55) and the possibility of their structural rearrangements (52). The new observations, together with previously published data (38,39), strongly support the approach of allotopic expression of mitochondrially targeted RNAs as a powerful tool for different kinds of disorders caused by mutations in mitochondrial tRNA-coding genes.

## ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Dr E. A. Shoubridge (Montreal Neurological Institute and Hospital) for providing the MELAS cell line; Dr M. Sissler (IBMC, Strasbourg) for providing the hmLysRS expressing construct; Dr H. Puccio and Dr. Irwin Davidson (IGBMC, Strasbourg) for the help with lentiviral transfections, Dr F. Monneaux and Dr. F. Gros (IBMC, Strasbourg) for the help with FACS analysis.

## FUNDING

Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Université de Strasbourg (UdS); Agence Nationale de la Recherche (ANR); Fondation pour la Recherche Médicale (FRM); the ARCUS grant (collaboration Alsace Region – Russie–Ukraine); Association Française contre les Myopathies (AFM). Funding for open access charge: ANR.

*Conflict of interest statement.* None declared.

## REFERENCES

- 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.
- Chinnery, P.F., Johnson, M.A., Wardell, T.M., Singh-Kler, R., Hayes, C., Brown, D.T., Taylor, R.W., Bindoff, L.A. and Turnbull, D.M. (2000) The epidemiology of pathogenic mitochondrial DNA mutations. *Ann. Neurol.*, **48**, 188–193.
- Majamaa, K., Moilanen, J.S., Uimonen, S., Remes, A.M., Salmela, P.I., Karppa, M., Majamaa-Voltti, K.A., Rusanen, H., Sorri, M., Peuhkurinen, K.J. *et al.* (1998) Epidemiology of A3243G, the mutation for mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes: prevalence of the mutation in an adult population. *Ma. J. Hum. Genet.*, **63**, 447–454.
- Uusimaa, J., Moilanen, J.S., Vainionpää, L., Tapanainen, P., Lindholm, P., Nuutinen, M., Lopponen, T., Maki-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.
- Ruiz-Pesini, E., Lott, M.T., Procaccio, V., Poole, J.C., Brandon, M.C., Mishmar, D., Yi, C., Kreuziger, J., Baldi, P. and Wallace, D.C. (2007) An enhanced MITOMAP with a global mtDNA mutational phylogeny. *Nucleic Acids Res.*, **35**, D823–D828.
- Shanske, S., Pancrudo, J., Kaufmann, P., Engelstad, K., Jhung, S., Lu, J., Naini, A., DiMauro, S. and De Vivo, D.C. (2004) Varying loads of the mitochondrial DNA A3243G mutation in different tissues: implications for diagnosis. *Am. J. Med. Genet.*, **130A**, 134–137.
- Fornuskova, D., Brantova, O., Tesarova, M., Stiburek, L., Honzik, T., Wenchich, L., Tietzeova, E., Hansikova, H. and Zeman, J. (2008) The impact of mitochondrial tRNA mutations on the amount of ATP synthase differs in the brain compared to other tissues. *Biochim. Biophys. Acta*, **1782**, 317–325.
- Dubeau, F., De Stefano, N., Zifkin, B.G., Arnold, D.L. and Shoubridge, E.A. (2000) Oxidative phosphorylation defect in the brains of carriers of the tRNA(Leu)(UUR) A3243G mutation in a MELAS pedigree. *Ann. Neurol.*, **47**, 179–185.
- Borner, G.V., Zeviani, M., Tiranti, V., Carrara, F., Hoffmann, S., Gerbitz, K.D., Lochmuller, H., Pongratz, D., Klopstock, T., Melberg, A. *et al.* (2000) Decreased aminoacylation of mutant tRNAs in MELAS but not in MERRF patients. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 467–475.
- 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.
- King, M.P., Koga, Y., Davidson, M. and Schon, E.A. (1992) Defects in mitochondrial protein synthesis and respiratory chain activity segregate with the tRNA(Leu)(UUR) mutation associated with mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke like episodes. *Mol. Cell Biol.*, **12**, 480–490.
- El Meziane, A., Lehtinen, S.K., Hance, N., Nijtmans, L.G., Dunbar, D., Holt, I.J. and Jacobs, H.T. (1998) A tRNA suppressor mutation in human mitochondria. *Nature Genet.*, **18**, 350–353.
- Park, H., Davidson, E. and King, M.P. (2003) The pathogenic A3243G mutation in human mitochondrial tRNA(Leu)(UUR) decreases the efficiency of aminoacylation. *Biochemistry*, **42**, 958–964.
- Helm, M., Florentz, C., Chomyn, A. and Attardi, G. (1999) Search for differences in post-transcriptional modification patterns of mitochondrial DNA-encoded wild-type and mutant human tRNA(Lys) and tRNA(Leu)(UUR). *Nucleic Acids Res.*, **27**, 756–763.
- 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. USA*, **101**, 15070–15075.
- Yasukawa, T., Kirino, Y., Ishii, N., Holt, I.J., Jacobs, H.T., Makifuchi, T., Fukuhara, N., Ohta, S., Suzuki, T. and Watanabe, K. (2005) Wobble modification deficiency in mutant tRNAs in patients with mitochondrial diseases. *FEBS Lett.*, **579**, 2948–2952.
- Yasukawa, T., Suzuki, T., Ueda, T., Ohta, S. and Watanabe, K. (2000) Modification defect at anticodon wobble nucleotide of mitochondrial tRNAs(Leu)(UUR) with pathogenic mutations of mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes. *J. Biol. Chem.*, **275**, 4251–4257.
- 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.
- James, A.M., Wei, Y.H., Pang, C.Y. and Murphy, M.P. (1996) Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochem. J.*, **318** (Pt 2), 401–407.
- 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.
- 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. USA*, **89**, 4221–4225.
22. Flierl, A., Reichmann, H. and Seibel, P. (1997) Pathophysiology of the MELAS 3243 transition mutation. *J. Biol. Chem.*, **272**, 27189–27196.
  23. Janssen, G.M., Hensbergen, P.J., van Bussel, F.J., Balog, C.I., Maassen, J.A., Deelder, A.M. and Raap, A.K. (2007) The A3243G tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) mutation induces mitochondrial dysfunction and variable disease expression without dominant negative acting translational defects in complex IV subunits at UUR codons. *Hum. Mol. Genet.*, **16**, 2472–2481.
  24. Marriage, B., Clandinin, M.T. and Glerum, D.M. (2003) Nutritional cofactor treatment in mitochondrial disorders. *J. Am. Dietetic Assoc.*, **103**, 1029–1038.
  25. Tachibana, M., Sparman, M., Sritanandomchai, H., Ma, H., Clepper, L., Woodward, J., Li, Y., Ramsey, C., Kolotushkina, O. and Mitalipov, S. (2009) Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature*, **461**, 367–372.
  26. Craven, L., Tuppen, H.A., Greggains, G.D., Harbottle, S.J., Murphy, J.L., Cree, L.M., Murdoch, A.P., Chinnery, P.F., Taylor, R.W., Lightowlers, R.N. et al. (2010) Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature*, **465**, 82–85.
  27. Park, H., Davidson, E. and King, M.P. (2008) Overexpressed mitochondrial leucyl-tRNA synthetase suppresses the A3243G mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *RNA*, **14**, 2407–2416.
  28. Li, R. and Guan, M.X. (2010) Human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase corrects mitochondrial dysfunctions due to the tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) A3243G mutation, associated with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like symptoms and diabetes. *Mol. Cell Biol.*, **30**, 2147–2154.
  29. Feuermann, M., Francisci, S., Rinaldi, T., De Luca, C., Rohou, H., Frontali, L. and Bolotin-Fukuhara, M. (2003) The yeast counterparts of human 'MELAS' mutations cause mitochondrial dysfunction that can be rescued by overexpression of the mitochondrial translation factor EF-Tu. *EMBO Rep.*, **4**, 53–58.
  30. Magalhaes, P.J., Andreu, A.L. and Schon, E.A. (1998) Evidence for the presence of 5S rRNA in mammalian mitochondria. *Mol. Biol. Cell*, **9**, 2375–2382.
  31. Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Dogan, S., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (2001) 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *J. Biol. Chem.*, **276**, 45642–45653.
  32. Smirnov, A., Tarassov, I., Mager-Heckel, A.M., Letzelter, M., Martin, R.P., Krasheninnikov, I.A. and Entelis, N. (2008) Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria. *RNA*, **14**, 749–759.
  33. Rubio, M.A., Rinehart, J.J., Krett, B., Duvezin-Caubet, S., Reichert, A.S., Soll, D. and Alfonzo, J.D. (2008) Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **105**, 9186–9191.
  34. Smirnov, A., Comte, C., Mager-Heckel, A.M., Addis, V., Krasheninnikov, I.A., Martin, R.P., Entelis, N. and Tarassov, I. (2010) Mitochondrial enzyme rhodanese is essential for 5 S ribosomal RNA import into human mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **285**, 30792–30803.
  35. Puranam, R.S. and Attardi, G. (2001) The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Mol. Cell Biol.*, **21**, 548–561.
  36. Wang, G., Chen, H.W., Oktay, Y., Zhang, J., Allen, E.L., Smith, G.M., Fan, K.C., Hong, J.S., French, S.W., McCaffery, J.M. et al. (2010) PNPASE Regulates RNA Import into Mitochondria. *Cell*, **142**, 456–467.
  37. Kolesnikova, O., Kazakova, H., Comte, C., Steinberg, S., Kamenski, P., Martin, R.P., Tarassov, I. and Entelis, N. (2010) Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria. *RNA*, **16**, 926–941.
  38. Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Mireau, H., Fox, T.D., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (2000) Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science*, **289**, 1931–1933.
  39. Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Jacquin-Becker, C., Goltzene, F., Chrzanoska-Lightowlers, Z.M., Lightowlers, R.N., Martin, R.P. and Tarassov, I. (2004) Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum. Mol. Genet.*, **13**, 2519–2534.
  40. Bakker, A., Barthelemy, C., Frachon, P., Chateau, D., Sternberg, D., Mazat, J.P. and Lombes, A. (2000) Functional mitochondrial heterogeneity in heteroplasmic cells carrying the mitochondrial DNA mutation associated with the MELAS syndrome (mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes). *Pediatr. Res.*, **48**, 143–150.
  41. King, M.P. and Attardi, G. (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science*, **246**, 500–503.
  42. Entelis, N.S., Kieffer, S., Kolesnikova, O.A., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (1998) Structural requirements of tRNA<sup>Leu</sup> for its import into yeast mitochondria. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **95**, 2838–2843.
  43. Moffat, J., Grueneberg, D.A., Yang, X., Kim, S.Y., Kloefer, A.M., Hinkle, G., Piqani, B., Eisenhaure, T.M., Luo, B., Grenier, J.K. et al. (2006) A lentiviral RNAi library for human and mouse genes applied to an arrayed viral high-content screen. *Cell*, **124**, 1283–1298.
  44. Sohm, B., Frugier, M., Brule, H., Olszak, K., Przykorska, A. and Florentz, C. (2003) Towards understanding human mitochondrial leucine aminoacylation identity. *J. Mol. Biol.*, **328**, 995–1010.
  45. Sohm, B., Sissler, M., Park, H., King, M.P. and Florentz, C. (2004) Recognition of human mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup>(UUR) by its cognate leucyl-tRNA synthetase. *J. Mol. Biol.*, **339**, 17–29.
  46. Tolkunova, E., Park, H., Xia, J., King, M.P. and Davidson, E. (2000) The human lysyl-tRNA synthetase gene encodes both the cytoplasmic and mitochondrial enzymes by means of an unusual alternative splicing of the primary transcript. *J. Biol. Chem.*, **275**, 35063–35069.
  47. Moraes, C.T., Ricci, E., Bonilla, E., DiMauro, S. and Schon, E.A. (1992) The mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) mutation in mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes (MELAS): genetic, biochemical, and morphological correlations in skeletal muscle. *Am. J. Hum. Genet.*, **50**, 934–949.
  48. Entelis, N., Kolesnikova, O., Kazakova, H., Brandina, I., Kamenski, P., Martin, R.P. and Tarassov, I. (2002) Import of nuclear encoded RNAs into yeast and human mitochondria: experimental approaches and possible biomedical applications. *Genet. Eng.*, **24**, 191–213.
  49. Varshney, U., Lee, C.P. and RajBhandary, U.L. (1991) Direct analysis of aminoacylation levels of tRNAs in vivo. Application to studying recognition of Escherichia coli initiator tRNA mutants by glutamyl-tRNA synthetase. *J. Biol. Chem.*, **266**, 24712–24718.
  50. Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680–685.
  51. Kolesnikova, O., Entelis, N., Kazakova, H., Brandina, I., Martin, R.P. and Tarassov, I. (2002) Targeting of tRNA into yeast and human mitochondria: the role of anticodon nucleotides. *Mitochondrion*, **2**, 95–107.
  52. Kolesnikova, O., Kazakova, H., Comte, C., Steinberg, S., Kamenski, P., Martin, R.P., Tarassov, I. and Entelis, N. (2010) Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria. *RNA*, **16**, 926–941.
  53. Tarassov, I., Entelis, N. and Martin, R. (1995) Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *EMBO J.*, **14**, 3461–3471.
  54. Entelis, N.S., Kolesnikova, O.A., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (2001) RNA delivery into mitochondria. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **49**, 199–215.

55. Entelis, N.S., Krasheninnikov, I.A., Martin, R.P. and Tarassov, I.A. (1996) Mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA (Lys): possible roles of aminoacylation and modified nucleosides in subcellular partitioning. *FEBS Lett.*, **384**, 38-42.
56. Enriquez, J.A., Cabezas-Herrera, J., Bayona-Bafaluy, M.P. and Attardi, G. (2000) Very rare complementation between mitochondria carrying different mitochondrial DNA mutations points to intrinsic genetic autonomy of the organelles in cultured human cells. *J. Biol. Chem.*, **275**, 11207-11215.
57. Tukey, J.W. (1977) *Exploratory Data Analysis*. Addison-Wesley, Reading, MA.

## الملخص

الميتوكوندريا عضيات أساسية للخلايا حقيقية النواة، فهي تشكل المركز الأساسي لتوليد الطاقة اللازمة للجسم، بالإضافة إلى ذلك فلها دور مهم في كثير من التفاعلات الحيوية، على غرار الموت الخلوي المبرمج. وهي أيضا عرضة لأمراض عدة مستعصية العلاج، فقد أحصي عدد كبير منها والتي يكون سببها على الغالب طفرات في حمضها النووي. ولئن استعملت كثير من الأدوية لعلاج هذه الأمراض، فقد باء جُلها بالفشل. من هنا فكّر الباحثون في إيجاد طرق علاج بديلة وفعالة، من بينها العلاج الجيني والتي من خلاله يتم تغيير المورثات الطافرة بأخرى سليمة تمكن الميتوكوندريا من استعادة نشاطها. من بين الأفكار المتداولة في هذا المجال واحدة تقوم على أساس زرع مورثة خاصة ببروتين ميتوكوندي في سلسلة الحمض النووي الخلوي، وعندما يتم استنساخها في النواة، ترجعها إلى بروتين (الحاوي في مقدمته على علامة التوجيه إلى الميتوكوندريا) في السيتوبلازم، وبعدها يتم نقله إلى الميتوكوندريا، وهناك يُعوض البروتين الطافر. بالإضافة إلى ذلك تم تجربة فكرة أخرى تتمثل في استعمال الأحماض النووية الببتيدية (PNA) التي لها القدرة على الالتصاف و الالتصاق ب(DNA) الحاوي على الطفرات مما يؤدي إلى تعطيل تضاعفه و هذا ما يسمح بزوال أعراض المرض. ومن بين الطرق كذلك إدخال ARN الناسخ إلى الميتوكوندريا لتعويض ARN الناقل الميتوكوندري الطافر مما يسمح بإنتاج بروتينات نشطة، وهي نفس الفكرة التي استخدمت في المخبر وتم الحصول على نتائج مشجعة، والآن نسعى لتجربتها على مستعمرات خلايا خاصة تسمى الخلايا هجينة السيتوبلازم (و هي خلايا ناتجة عن إدماج خليتين إحداها خلية سرطان العظام تحتوي على النواة فقط بدون ميتوكوندريا والأخرى من خلايا العضلات لشخص مريض تحتوي على ميتوكوندريا فقط)، و تعتبر هذه الخلايا أنموذجا لدراسة أمراض الميتوكوندريا. خلال التربص قمت بتحديد مختلف خصائصها الفسيولوجية(التنفس)، الحيوية (النشاط الإنزيمي) وكذا الجزيئية (مستوى بروتينات السلسلة التنفسية) مع مقارنتها بسلاطة طبيعية. وتحصلنا على نتائج مشابهة لتلك التي تحصلت عليها مخبر بحث أخرى. فممكننا تأكيد أن هذه الخلايا تعتبر فعلا نموذجا مميّزا و الذي من خلالها نستطيع تجربة فكرتنا للعلاج الجيني.

**الكلمات المفاتيح:** الميتوكوندريا، أمراض الميتوكوندريا، العلاج الجيني، ARN الناسخ، الخلايا هجينة السيتوبلازم.

## **Abstract**

Mitochondria are organelles essential for eukaryotic cells. They are also linked to several human diseases whose cause is often mutations in mitochondrial DNA. Several types of mutations have been described. In most mitochondrial diseases, the biochemical treatment was ineffective and gene therapy appears to offer an attractive alternative. There are several possible approaches in this context, as the expression of proteins that allotropic is to send in the mitochondria of Chimeric mitochondrial genes expressed in the nuclear genome, or the so-called "antigenomic approach" based on the ability of synthetic agents to selectively inhibit replication of mutated mtDNA in promoting the spread of wild mtDNA. As part of my course we have optimized methods of molecular analysis of mitochondrial proteins, characterized and compared the mitochondrial function of cultured cells (mutated and wild). We also approved the cellular model used for the study of mitochondrial disease which is cybrid cells. This work would allow us to conduct tests to model a gene therapy approach that would operate a gene therapy approach based on the import of tRNA<sup>Lys</sup> recombinant human mitochondria and to test the effect of RNA on the functions mitochondrial cybrids cultured human cells.

**Key words:** Mitochondria; mitochondrial disorders, tRNA<sup>Lys</sup>; cybrid cells; gene therapy

## Résumé

Les mitochondries sont des organites essentiels pour les cellules eucaryotes. Elles sont également liées à plusieurs maladies humaines dont la cause est souvent des mutations dans l'ADN mitochondrial. Plusieurs types de mutations ont été décrits. Dans la plupart des maladies mitochondriales, le traitement biochimique s'est avéré inefficace et la thérapie génique semble offrir une alternative intéressante. Il existe plusieurs approches possibles dans ce contexte, comme l'expression allotopique des protéines qui consiste à adresser dans les mitochondries des gènes mitochondriaux chimériques exprimés dans le génome nucléaire, ou encore l'approche dite «anti-génomique», basée sur la capacité des agents synthétiques à inhiber sélectivement la réplication d'un ADNmt muté en favorisant la propagation de l'ADNmt sauvage. Enfin, l'autre approche est basée sur l'import des ARN dans les mitochondries, ou cet import est utilisé pour compléter la mutation dans le gène codant pour un ARNt mitochondrial. Dans le cadre de mon stage nous avons optimisé des méthodes moléculaire d'analyses des protéines mitochondriales, caractérisé et comparé les fonctions mitochondriales des cellules en culture (mutées et sauvages). Nous avons aussi approuvé le modèle cellulaire utilisé pour l'étude des anomalies mitochondriales qui sont des cellules cybrides. Ce travail nous permettrait d'effectuer des tests afin de modéliser une approche de thérapie génique qui exploiterait une approche de thérapie génique basée sur l'import de l'ARNt<sup>Lys</sup> recombinant dans les mitochondries humaines et de tester l'effet de ces ARN sur les fonctions mitochondriales cybrides des cellules humaines en culture.

**Mots clés :** Mitochondrie, maladies mitochondriales, ARNt<sup>Lys</sup>, cellules cybrides, thérapie génique.

## المخلص

الميتوكوندريا عضيات أساسية للخلايا حقيقية التواة، فهي تشكل المركز الأساسي لتوليد الطاقة اللازمة للجسم، بالإضافة إلى ذلك فلها دور مهم في كثير من التفاعلات الحيوية، على غرار الموت الخلوي المبرمج. وهي أيضا عرضة لأمراض عدة مستعصية العلاج، فقد أحيى عدد كبير منها والتي يكون سببها على الغالب طفرات في حمضها النووي. ولئن استعملت كثير من الأدوية لعلاج هذه الأمراض، فقد باء جملها بالفشل. من هنا فكر الباحثون في إيجاد طرق علاج بديلة وفعالة، من بينها العلاج الجيني والتي من خلاله يتم تغيير المورثات الطافرة بأخرى سليمة تمكن الميتوكوندريا من استعادة نشاطها. من بين الأفكار المتناولة في هذا المجال واحدة تقوم على أساس زرع مورثة خاصة ببروتين ميتوكوندري في سلسلة الحمض النووي الخلوي، وعندما يتم استنساخها في النواة، ترجمتها إلى بروتين (الحاوي في مقدمته على علامة التوجيه إلى الميتوكوندريا) في السيتوبلازم، وبعدها يتم نقله إلى الميتوكوندريا، وهناك يموض البروتين الطافر. بالإضافة إلى ذلك تم تجربة فكرة أخرى تتمثل في استعمال الأحماض النووية الببتيدية (PNA) التي لها القدرة على الالتصاف و الانصاف ب(DNA) الحاوي على الطفرات مما يؤدي إلى تعطيل تضاعفه وهذا ما يسمح بزوال أعراض المرض. ومن بين الطرق كذلك إدخال ARN الناسخ إلى الميتوكوندريا لتعويض ARN الناقل الميتوكوندري الطافر مما يسمح بإنتاج بروتينات نشطة، وهي نفس الفكرة التي استخدمت في المخبر وتم الحصول على نتائج مشجعة، والآن تسعى لتجربتها على مستعمرات خلايا خاصة تسمى الخلايا هيمنة السيتوبلازم (وهي خلايا ناتجة عن إدماج خليتين إحداها خلية سرطان العظام تحتوي على النواة فقط بدون ميتوكوندريا والأخرى من خلايا العضلات لشخص مريض تحتوي على ميتوكوندريا فقط)، وتعتبر هذه الخلايا أنموذجا لدراسة أمراض الميتوكوندريا. خلال التريض قمت بتحديد مختلف خصائصها الفسيولوجية(التنفس)، الحيوية (النشاط الإنزيمي) وكذا الحيزية (مستوى بروتينات السلسلة التنفسية) مع مقارنتها بسلالة طبيعية وتحصلنا على نتائج مشابهة لتلك التي تحصلت عليها مخابر بحث أخرى. فممكننا تأكد أن هذه الخلايا تعتبر فعلا نموذجا مبرزا والذي من خلالها نستطيع تجربة فكرتنا للعلاج الجيني.

**الكلمات المفاتيح:** الميتوكوندريا، أمراض الميتوكوندريا، العلاج الجيني، ARN الناسخ، الخلايا هيمنة السيتوبلازم.

## Abstract

Mitochondria are organelles essential for eukaryotic cells. They are also linked to several human diseases whose cause is often mutations in mitochondrial DNA. Several types of mutations have been described. In most mitochondrial diseases, the biochemical treatment was ineffective and gene therapy appears to offer an attractive alternative. There are several possible approaches in this context, as the expression of proteins that allotropic is to send in the mitochondria of Chimeric mitochondrial genes expressed in the nuclear genome, or the so-called "antigenomic approach" based on the ability of synthetic agents to selectively inhibit replication of mutated mtDNA in promoting the spread of wild mtDNA. As part of my course we have optimized methods of molecular analysis of mitochondrial proteins, characterized and compared the mitochondrial function of cultured cells (mutated and wild). We also approved the cellular model used for the study of mitochondrial disease which is cybrid cells. This work would allow us to conduct tests to model a gene therapy approach that would operate a gene therapy approach based on the import of tRNALys recombinant human mitochondria and to test the effect of RNA on the functions mitochondrial cybrids cultured human cells.

**Key words:** Mitochondria; mitochondrial disorders, tRNA<sup>Lys</sup>; cybrid cells; gene therapy

## Résumé

Les mitochondries sont des organites essentiels pour les cellules eucaryotes. Elles sont également liées à plusieurs maladies humaines dont la cause est souvent des mutations dans l'ADN mitochondrial. Plusieurs types de mutations ont été décrits. Dans la plupart des maladies mitochondriales, le traitement biochimique s'est avéré inefficace et la thérapie génique semble offrir une alternative intéressante. Il existe plusieurs approches possibles dans ce contexte, comme l'expression allotopique des protéines qui consiste à adresser dans les mitochondries des gènes mitochondriaux chimériques exprimés dans le génome nucléaire, ou encore l'approche dite «anti-génomique», basée sur la capacité des agents synthétiques à inhiber sélectivement la réplication d'un ADNmt muté en favorisant la propagation de l'ADNmt sauvage. Enfin, l'autre approche est basée sur l'import des ARN dans les mitochondries, ou cet import est utilisé pour compléter la mutation dans le gène codant pour un ARNt mitochondrial. Dans le cadre de mon stage nous avons optimisé des méthodes moléculaire d'analyses des protéines mitochondriales, caractérisé et comparé les fonctions mitochondriales des cellules en culture (mutées et sauvages). Nous avons aussi approuvé le modèle cellulaire utilisé pour l'étude des anomalies mitochondriales qui sont des cellules cybrides. Ce travail nous permettrait d'effectuer des tests afin de modéliser une approche de thérapie génique qui exploiterait une approche de thérapie génique basée sur l'import de l'ARNt<sup>Lys</sup> recombinant dans les mitochondries humaines et de tester l'effet de ces ARN sur les fonctions mitochondriales cybrides des cellules humaines en culture.

**Mots clés :** Mitochondrie, maladies mitochondriales, ARN<sup>Lys</sup>, cellules cybrides, thérapie génique.

