

Université de Strasbourg  
Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de  
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE STRASBOURG

Discipline : Sciences du vivant

Domaine : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

par

Caroline COMTE

## **Caractérisation d'ARN artificiels importables dans les mitochondries humaines à des fins thérapeutiques**

Soutenue le 9 décembre 2010 devant la commission d'examen

Dr A. RÖTIG	Rapporteur externe
Dr R. BORDONNE	Rapporteur externe
Dr M. SISSLER	Rapporteur interne
Dr M. BOLOTIN-FUKUHARA	Examinatrice
Dr R.P. MARTIN	Directeur de thèse
Dr N. ENTELIS	Co-directeur de thèse

UMR N°7156 Uds-CNRS

« Génétique Moléculaire, Génomique, Microbiologie »





## Remerciements

Je remercie tout d'abord les membres du jury, les docteurs Agnès Rötig, Remy Bordonné, Monique Bolotin-Fukuhara et Marie Sissler de m'avoir fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Je tiens ensuite à remercier Ivan Tarassov, alias Vania, de m'avoir accueillie dans son équipe lors de mon stage de master et de m'avoir proposé ce passionnant sujet de thèse. Je le remercie également pour sa disponibilité, son aide logistique et ses conseils.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes deux directeurs de thèse Robert Martin et Nina Entelis qui, chacun à leur manière, ont su me guider dans l'accomplissement de ces travaux.

Merci tout d'abord à Robert de m'avoir consacré de son temps, d'avoir enrichi mon travail de sa clairvoyance, de ses conseils avisés et de ses critiques toujours constructives.

Quant à Nina, je ne la remercierai jamais assez pour l'attention quotidienne qu'elle m'a portée, pour son aide, ses innombrables conseils, nos discussions et pour m'avoir finalement tant apporté et tant appris : je n'aurais pu rêver meilleure directrice de thèse.

Une fois n'est pas coutume, je ne remercierai pas deux personnes. Je ne remercierai ni Yann ni Anne Marie d'avoir été des collègues si exceptionnels que la simple idée de ne bientôt plus pouvoir travailler à leurs côtés me plonge dans un incommensurable effroi. Mais parce que cette thèse aurait sans nul doute été bien différente sans leur présence, leur aide, leur inconditionnel soutien, et surtout, surtout, leurs éclats de rire quotidiens, c'est à eux que la dédie (en espérant qu'ils sauront continuer la lutte!).

Je n'oublie bien sûr pas le reste de l'équipe Mito dans laquelle ce fut un si grand bonheur de travailler au cours de ces trois ans. Спасибо à mes « compatriotes de thèse » russes Sacha et Olga qui ont été là depuis le début, et que j'ai tant admiré pour leur qualités aussi bien scientifiques que humaines (ainsi que pour leur français si parfait !). Merci à Tom pour sa sympathie, ses talents pâtisseries et sa promptitude à rendre service. Merci à Ali, à qui je souhaite bonne chance dans la poursuite du projet et que je regrette de ne pas avoir eu le temps de mieux connaître. Merci à Mike pour son enthousiasme et sa bonne humeur. Merci

aux anciens, grande Olga et Yuri pour leur partage de la culture russe et tous les conseils à mon arrivée au labo. Merci enfin à Katya pour sa gentillesse et pour les bons moments passés ensemble au Portugal.

Je tiens bien sûr à remercier tous nos voisins du quatrième étage de l'IPCB qui, grâce à leur dynamisme et aux nombreux pots organisés, font de cet endroit un lieu si agréable non seulement à travailler mais également à vivre. Merci aux membres actuels, Sylvie, Aline K, Bruno, Joëlle, Fanny, Johan, Dimitri, Serge, Barbara, Aline H., Matthias, Ray, Lydia, Christiane et Angélique ainsi qu'aux anciens Cathy, Vanessa, Amar, Salomeh, Laetitia, Salima, Vincent, Gladys, Guillaume et Audrey.

Je remercie également le Dr. D. Pyshnyi et son équipe pour la synthèse des oligonucléotides modifiés ayant servis à la poursuite de mon travail.

Avant de terminer je voudrais aussi remercier toute l'équipe de monitorat biochimie : Merci aux gentils organisateurs Joern et Fabrice d'avoir rendu la transition thèse/enseignement si facile. Merci à tous les moniteurs pour les moments passés avec les étudiants en salle de TP, autour d'un café et lors des sorties : merci à Gaëlle et Malou, Mathieu et Samira, Paul et Anne, Cédric, Cyrille, Nour et Frederic ainsi qu'à Fernande et Thomas.

Et enfin, parce que la Science n'est pas tout et que sans eux je ne serais rien, je ne remercierai jamais assez mes parents, ma sœur Marie et mon frère Pierre, ma famille et mes amis pour être là pour moi, toujours, tout simplement.



# **TABLE DES MATIERES**



<b>TABLE DES MATIERES.....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>2</b>
<b>INTRODUCTION .....</b>	<b>4</b>
<b>I La mitochondrie .....</b>	<b>5</b>
1 Structure .....	5
2 Fonctions .....	6
3 Génétique mitochondriale .....	7
3.1 Diversité des génomes mitochondriaux .....	7
3.2 Le génome mitochondrial humain.....	8
3.3 Organisation de l'ADN mitochondrial humain en nucléoïde.....	9
3.4 Transcription .....	10
3.5 Réplication .....	11
3.5.1 Protéines de la réplication .....	11
3.5.2 Les mécanismes de la réplication.....	12
3.6 Réparation .....	14
<b>II Les maladies mitochondriales .....</b>	<b>16</b>
1 Présentation générale.....	16
2 Maladies liées à des mutations dans l'ADN mitochondrial .....	17
2.1 Caractéristiques générales .....	17
2.1.1 L'hétéroplasmie.....	18
2.1.2 La ségrégation mitotique.....	18
2.1.3 La théorie du bottleneck.....	19
2.2 Types de mutations.....	19
2.2.1 Réarrangements de l'ADNmt.....	19
2.2.2 Mutations ponctuelles .....	21
3 Les mutations du génome nucléaire .....	24
3.1 Mutations nucléaires des gènes de structure et d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire.....	24
3.2 Mutations nucléaires associées à une atteinte qualitative et quantitative de l'ADNmt.....	25
3.2.1 Mutations provoquant des délétions de l'ADNmt.....	25
3.2.2 Mutations provoquant des déplétions de l'ADNmt.....	26
3.3 Mutations nucléaires affectant le fonctionnement de la chaîne respiratoire de façon indirecte .....	26
4 Modèles d'études.....	27
<b>III Stratégies thérapeutiques .....</b>	<b>29</b>
1 Solutions palliatives .....	29
1.1 Procédures chirurgicales .....	29
1.2 Traitements pharmacologiques .....	29
2 Transfert cytosolique.....	30
3 Stimulation de la biogenèse mitochondriale .....	31
4 Thérapie génique .....	31
4.1 La stratégie allotopique .....	32
4.2 Modulation du taux d'hétéroplasmie.....	33
4.2.1 Expression allotopique d'enzymes de restriction.....	34

4.2.2	Régénération musculaire .....	35
4.2.3	Stratégie antigénomique .....	35
<b>IV</b>	<b>La voie d'import des ARN dans les mitochondries .....</b>	<b>37</b>
1	Généralités .....	37
2	Exemples de mécanismes d'importation .....	38
2.1	Mécanisme d'import chez le protozoaire <i>Leishmania tropica</i> .....	38
2.2	Mécanisme d'import chez la plante <i>Solanum tuberosum</i> .....	38
2.3	Mécanisme d'import chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	39
3	Importation d'ARN dans les mitochondries humaines. ....	40
4	Stratégies thérapeutiques reposant sur la voie d'importation des ARNmt .....	42
	<b>PROJET DE THESE .....</b>	<b>44</b>
	<b>RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>46</b>
<b>I</b>	<b>Caractérisation d'un nouvel ARN comme substrat d'importation dans les mitochondries humaines. ....</b>	<b>47</b>
1	Etude des déterminants d'importation de l'ARNt <sup>Lys</sup> CUU de la levure <i>S. cerevisiae</i> .....	47
2	Création d'un ARN artificiel importable dans les mitochondries humaines .....	48
3	Article n°1 .....	50
4	Résultats complémentaires : Etude du mécanisme d'import de TRK1 et de F1D1 dans les mitochondries humaines. ....	51
<b>II</b>	<b>Modélisation de la thérapie anti-génomique dans des cellules humaines par l'utilisation de la voie d'import des ARN dans les mitochondries .....</b>	<b>53</b>
1	Modèle d'étude .....	53
2	Utilisation de l'ARN F1D1 pour la construction d'ARN recombinants au potentiel anti-réplicatif .....	54
3	Evaluation <i>in vitro</i> du potentiel des ARN recombinants .....	56
3.1	Etude de la spécificité d'hybridation des ARN recombinants à l'ADNmt muté .....	56
3.2	Etude de l'effet des ARN recombinants par l'élaboration d'un .....	57
	test de réplication .....	57
3.2.1	Elaboration du test de réplication .....	57
3.2.2	Evaluation de l'effet des ARN recombinants .....	58
4	Evaluation <i>in vivo</i> du potentiel des ARN recombinants .....	58
4.1	Description des cellules utilisées .....	58
4.2	Transfection transitoire de cellules cybrides .....	59
4.3	Etude de la stabilité des ARN recombinants dans les cellules .....	60
4.4	Etude de l'importation des ARN recombinants dans les mitochondries .....	61
4.5	Etude de l'effet des ARN recombinants sur le taux d'hétéroplasmie .....	63
5	Article n°2 .....	65
<b>III</b>	<b>Tentatives d'optimisation de la stratégie anti-génomique .....</b>	<b>66</b>
1	Transfections consécutives des cellules cybrides .....	66
2	Transfection stable .....	67
3	Construction de nouveaux ARN recombinants .....	68
3.1	Modélisation de la structure des nouveaux ARN au potentiel anti-réplicatif .....	68
3.2	Etude de la stabilité et de l'import .....	69
3.3	Etude de l'effet sur l'hétéroplasmie .....	70

4	Modification chimique de l'insert anti-répliatif .....	71
4.1	Modification des inserts .....	71
4.2	Etude de l'impact des modifications sur la stabilité des ARN .....	72
4.3	Etude de l'impact des modifications sur l'import .....	72
4.4	Etude de l'impact des modifications sur le taux d'hétéroplasmie.....	73
<b>IV</b>	<b>Résultats non associés au projet de thèse .....</b>	<b>75</b>
	<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES .....</b>	<b>77</b>
<b>I</b>	<b>Analyse de l'import de l'ARN F1D1 et des ARN recombinants dans les mitochondries humaines .....</b>	<b>78</b>
1	Etude des facteurs d'import de TRK1 et F1D1 .....	79
2	Etude de l'ARN F1D1 comme vecteur d'importation .....	80
3	Etude des déterminants d'importation.....	81
<b>II</b>	<b>Analyse de l'effet des ARN recombinants sur le taux d'hétéroplasmie .....</b>	<b>83</b>
1	Compréhension du mécanisme qui préside à la baisse d'hétéroplasmie.....	84
2	Stabilisation du taux d'hétéroplasmie .....	85
3	Compréhension du mécanisme de la réplication.....	86
4	La baisse d'hétéroplasmie est-elle suffisante pour restaurer les fonctions respiratoires de la cellule?.....	88
	<b>MATERIEL ET METHODES .....</b>	<b>90</b>
<b>I</b>	<b>Matériel .....</b>	<b>91</b>
1	Lignées cellulaires.....	91
1.1	Souches bactériennes.....	91
1.2	Lignées cellulaires humaines .....	91
2	Milieux de culture .....	91
2.1	Milieu pour les souches bactériennes.....	91
2.2	Milieu pour les lignées humaines.....	91
3	Plasmides.....	92
4	Supports chromatographiques utilisés pour la séparation des protéines.....	92
5	Outils informatiques.....	93
<b>II</b>	<b>Méthodes .....</b>	<b>94</b>
1	Techniques relatives aux cellules humaines.....	94
1.1	Culture des cellules .....	94
1.2	Transfection de cellules.....	95
1.2.1	Transfection transitoire .....	95
1.2.2	Transfection stable .....	95
2	Techniques spécifiques aux acides nucléiques.....	96
2.1	Extraction des acides nucléiques des cellules humaines.....	96
2.1.1	Extraction de l'ADN total .....	96
2.1.2	Extraction de l'ARN.....	96
2.1.3	Extraction des ARN mitochondriaux .....	96
2.2	Amplification de l'ADN.....	97
2.2.1	Amplification par PCR.....	97

2.2.2	Mesure de taux d'hétéroplasmie des cellules cybrides par PCR quantitative en temps réel.....	98
2.3	Synthèse d'ARN.....	100
2.3.1	T7 transcription <i>in vitro</i> .....	100
2.3.2	T7 transcription d'ARN marqué par un fluorophore .....	101
2.4	Séparation électrophoretique des acides nucléiques .....	101
2.4.1	Electrophorèse sur gel d'agarose.....	101
2.4.2	Electrophorèse native sur gel de polyacrylamide.....	102
2.4.3	Electrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide.....	102
2.5	Marquage des acides nucléiques en 5' .....	102
2.5.1	Marquage des sondes oligonucléotidiques.....	102
2.5.2	Marquage de l'ARN.....	103
2.6	Hybridation moléculaire des acides nucleiques .....	104
2.6.1	Southern blot .....	104
2.6.2	Northern Blot.....	104
2.7	Technique de clonage et séquençage de l'ADN.....	106
2.7.1	Clonage.....	106
2.7.2	Séquençage.....	108
3	Test de la réplication <i>in vitro</i> .....	109
3.1	Préparation de la matrice simple et double brin.....	109
3.2	Isolement des enzymes de la réplication .....	110
3.3	Recherche de l'activité polymérase dans les fractions protéiques .....	110
3.4	Test de réplication .....	110
4	Test d'importation <i>in vitro</i> .....	111
4.1	Purification des facteurs protéiques pour les tests d'import <i>in vitro</i> .....	111
4.2	Gel de polyacrylamide protéique .....	112
4.3	Préparation des échantillons protéiques pour identification .....	112
	par spectrométrie de masse .....	112
4.4	Isolement des mitochondries humaines pour les tests d'import <i>in vitro</i> .....	113
4.5	Test d'importation dans les mitochondries isolées .....	113
	<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>115</b>
	<b>RESUME DE LA THESE.....</b>	<b>131</b>

# **ABBREVIATIONS**



ADN : Acide désoxyribonucléique  
 ADP : Adénosine-5'-diphosphate  
 AOX : Alternative oxydase  
 APS : Persulfate d'ammonium  
 ARN : Acide ribonucléique  
 ARNm : Acide ribonucléique messenger  
 ARNr : Acide ribonucléique ribosomique  
 ARNt : Acide ribonucléique de transfert  
 ATP : Adénosine triphosphate  
 BET : Bromure d'éthidium  
 BSA : Sérualbumine bovine  
 °C : Degré Celsius  
 CBS : Conserved sequence blocks  
 CoA : Coenzyme A  
 cpm : Coups par minute  
 Da : Dalton  
 dNTP : Désoxyribonucléotide-5'-triphosphate  
 dCTP : Désoxycytidine-5'-triphosphate  
 DMEM : Dulbecco's modified Eagles medium  
 DTT : Dithiothréitol  
 EDTA : Acide éthylène diaminetéracétique  
 FACS : Fluorescence activated cell sorting  
 FADH<sub>2</sub> : 1,5-dihydro-flavin adenine dinucleotide  
 FRET : Fluorescence resonance energy transfer  
 HSP : Heavy strand promoter  
 IPTG : Isopropyl-β-D-thiogalactoside  
 KDa : Kilodalton  
 KSS : Kearns Sayre Syndrome  
 KV : Kilo Volt  
 LB : Luria broth  
 M : Molaire  
 MALDI-TOF : Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight  
 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  
 MS-MS : Spectrométrie de masse en tandem  
 Mt : Mitochondrial  
 MTRPOL : Mitochondrial RNA polymerase  
 MTS : Mitochondrial targeting sequence  
 NADH : Nicotinamide adenine dinucleotide reduced form  
 NCR : Non coding region  
 μCi : Microcurie  
 NAD : Nicotinamide adénine dinucléotide  
 NARP : Neuropathy ataxia and retinis pigmentosa  
 Pb : Paire de base  
 PBS : Phosphate-buffered saline  
 PCR : Polymerase chaine reaction  
 PEO : Ophtalmoplegie progressive externe  
 pH : Potentiel hydrogène  
 PNA : Peptide nucleic acid

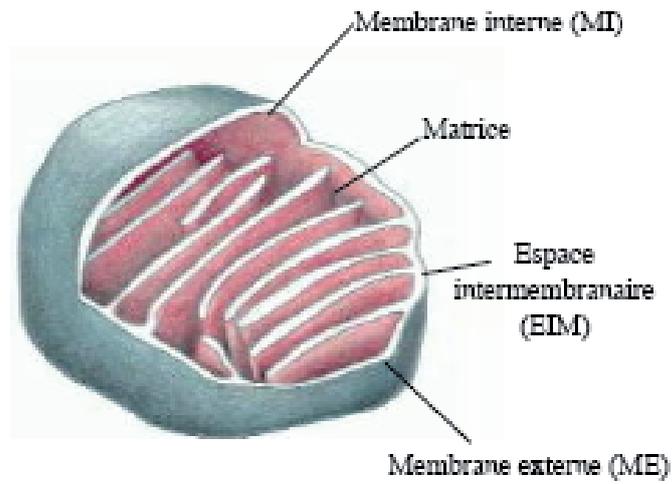
PNPASE : Polynucleotide phosphorylase  
POLG : ADN polymerase  $\gamma$  mitochondriale  
RIC : RNA import complex  
ROS : Reactive oxygen species  
Qsp : Quantité suffisante pour  
RNase : Ribonucléase  
RNasine : Inhibiteur de ribonucléase  
SDS : Sodium dodécylsulfate  
SSC : Standard sodium citrate  
SSB : Single Strand DNA Binding Protein  
TAE : Tris acétate EDTA  
TAS : Termination-associated sequence  
TBE : Tris borate EDTA  
TCA : Trichloroacetic acid  
TE : Tris-EDTA  
TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylène diamine  
TFAM : Mitochondrial transcription factor A  
TIM : Translocase of inner membrane  
TOM : Translocase of outer membrane  
Tris : Tris(hydroxyméthyl)aminométhane  
TRK1 : ARNt<sup>Lys</sup> CUU de levure  
TRK2 : ARNt<sup>Lys</sup> UUU de levure  
TRK3 : ARNt<sup>Lys</sup> UUU de levure mitochondrial  
UTR : Untranslated region  
UV : Ultra-violet  
VDAC : Voltage Dependant Anion Channel  
W : Watt  
X-Gal : 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranoside

# **INTRODUCTION**

A



B



**Figure 1 : La mitochondrie. Adapté de (Alberts et al, 1995)**

A) Vue par microscopie électronique.

B) Représentation schématique de la structure des mitochondries.

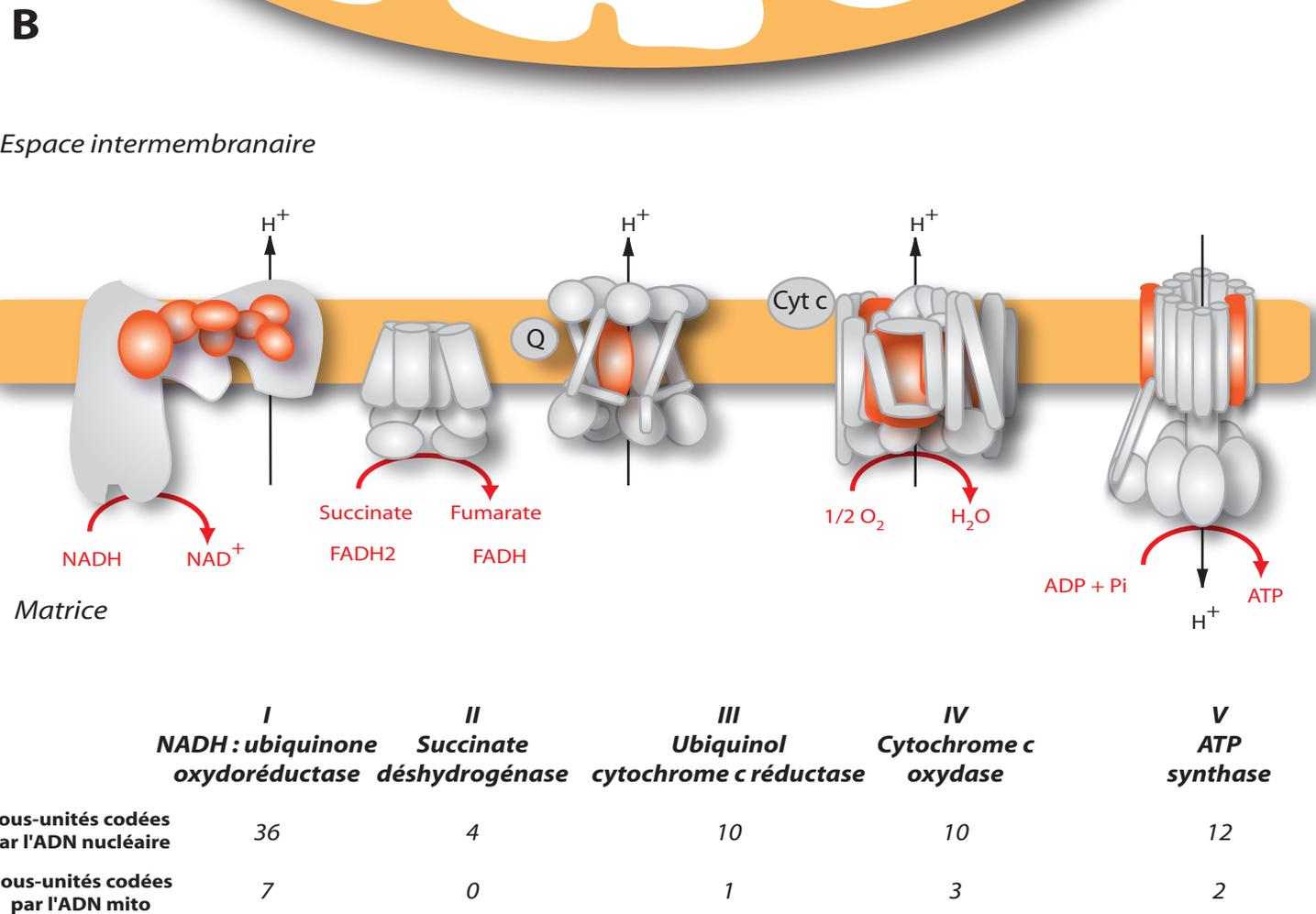
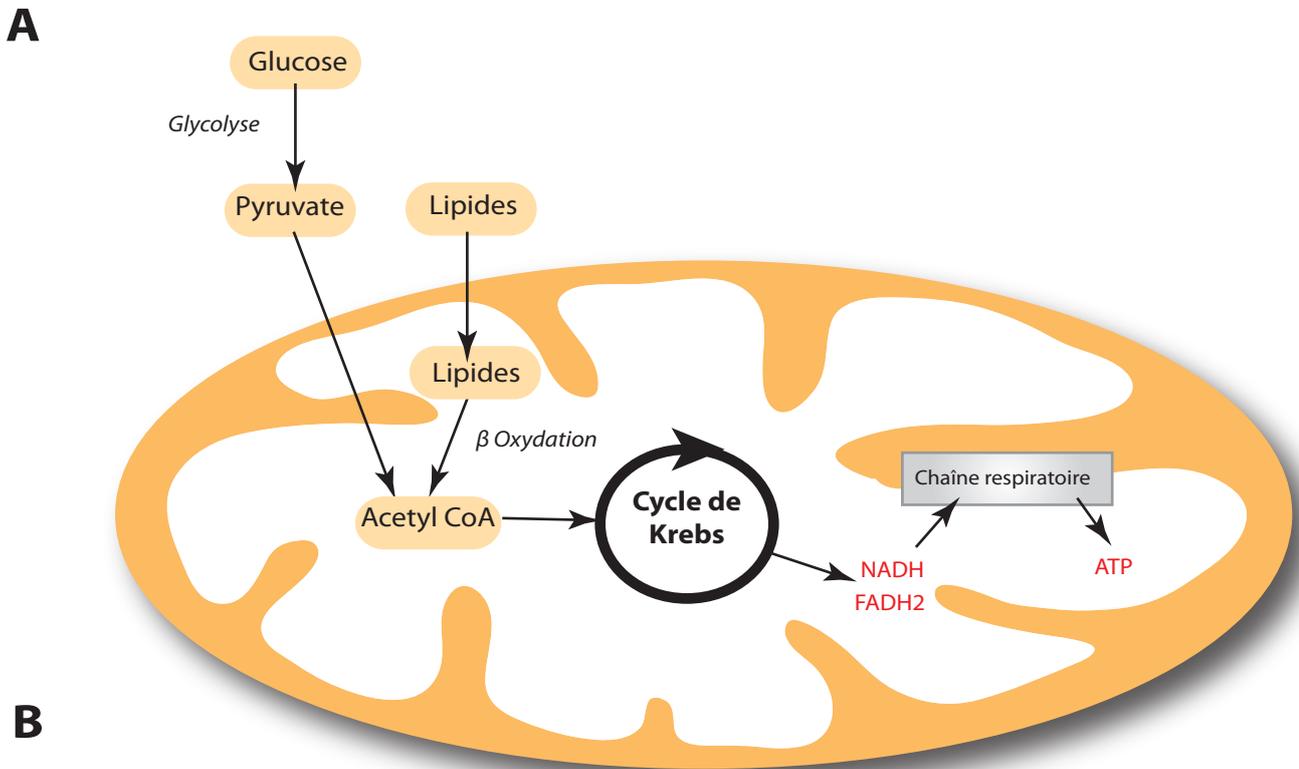
# I La mitochondrie

## 1 Structure

Organites pourvoyeurs d'énergie présents dans la majorité des cellules eucaryotes à l'exception de quelques protistes, les mitochondries doivent leur nom au biologiste allemand Benda qui les dénomma ainsi en 1897 en raison de leur aspect (du grec khondrion pour granules et mitos pour filamenteux). Le nombre, la taille et la forme des mitochondries varient selon le type cellulaire et dépendent de la demande en énergie, des conditions physiologiques et de l'environnement. En moyenne, une cellule humaine comprend environ 1000 mitochondries occupant 25% du volume cellulaire. Elles sont la plupart du temps organisées en réseau et peuvent se déplacer le long du cytosquelette, fusionner ou se diviser. Elles sont toutes composées d'une matrice protégée par deux membranes séparées par un espace intermembranaire (**Figure 1**).

La membrane externe est composée de 40% de lipides (phospholipides et cholestérol) et de 60% de protéines. La présence de canaux transmembranaires VDAC (Voltage-dependant anion channel) la rend semi perméable en permettant le passage de molécules de tailles inférieures à 10kDa (anions, cations, nucleotides 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 composée de 80% de protéines et de 20% de phospholipides. Afin d'augmenter sa surface, elle est repliée en de multiples crêtes qui peuvent adopter des formes différentes et adapter leur nombre en fonction de l'activité de la chaîne respiratoire. La composition lipidique est particulière car riche en cardiolipine et phosphatidylcholine qui joueraient un rôle dans le maintien d'une conformation fonctionnelle des complexes protéiques de la membrane interne. Le passage des molécules à travers cette dernière nécessite la présence de transporteurs spécifiques tels que la translocase ANT (adénine nucleotide translocase) pour transporter les nucléotides adényliques, le transporteur du phosphate inorganique, la navette du glycérol 3 phosphate ou encore celle du malate/aspartate. Les protéines sont quant à elles transloquées par le canal TIM (Translocase of the Inner Membrane).



**Figure 2 : La phosphorylation oxydative. Adapté de (Zeviani et al, 2004)**

A) Représentation schématique des processus aboutissant à la production d'ATP par la chaîne respiratoire.

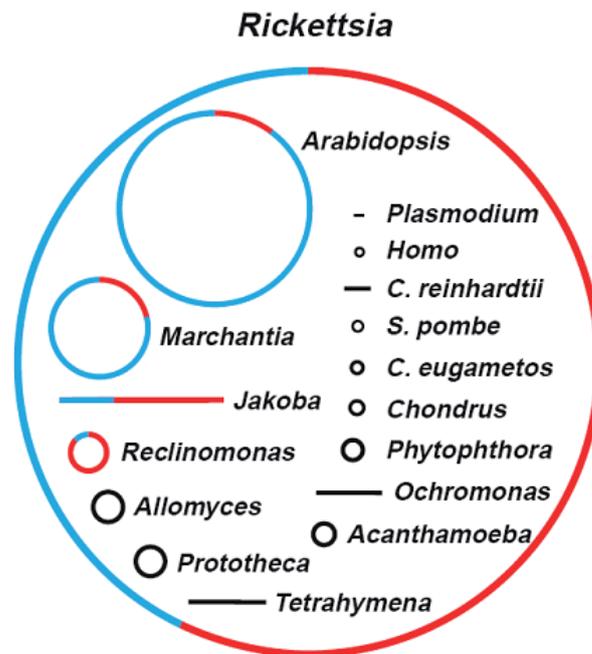
B) Représentation schématique de la chaîne respiratoire humaine. Les sous-unités codées par l'ADN nucléaire sont en gris et les sous-unités codées par l'ADNmt sont en orange.

## 2 Fonctions

Si les mitochondries sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires tels que l'apoptose, la thermogénèse, l'homéostasie du calcium, et de nombreuses voies anaboliques comme la synthèse de l'hème, des complexes fer-soufre, des acides aminés, ou encore des stéroïdes, leur rôle majeur consiste à convertir l'énergie contenue dans les molécules organiques sous une forme utilisable pour la cellule, l'ATP (adenosine triphosphate) (**Figure 2A**).

Ce processus se déroule en plusieurs étapes. Il débute par deux voies cataboliques : la glycolyse et la  $\beta$  oxydation. La glycolyse se déroule dans le cytoplasme et permet la dégradation du glucose en pyruvate. Ce dernier est ensuite importé dans la matrice mitochondriale où il est dégradé en Acetyl CoA, tout comme les lipides par le biais de la  $\beta$  oxydation. L'Acetyl CoA, en intégrant le cycle de Krebs, permet la formation des coenzymes réduits NADH et FADH<sub>2</sub>. Ces composés sont ensuite réoxydés par perte d'hydrogène fournissant des électrons transférés à la chaîne respiratoire. La chaîne respiratoire est un ensemble de 85 protéines différentes organisées en 5 complexes nommés de I à V tous localisés dans la membrane interne de la mitochondrie, ainsi que de deux transporteurs, le coenzyme Q et le cytochrome c. Les électrons fournis par NADH et FADH<sub>2</sub> en début de chaîne circulent par le biais de réactions d'oxydo-réduction séquentielles jusqu'au complexe IV où ils sont acceptés au final par une molécule d'oxygène réduite en eau. Ce flux d'électrons génère un gradient de protons entre la matrice mitochondriale et l'espace intermembranaire utilisé par le complexe V ou ATP synthase pour transformer l'ADP en ATP (Saraste, 1999). L'ensemble de ce processus, appelé phosphorylation oxydative, est d'une redoutable efficacité permettant de fournir près de 95% de l'énergie cellulaire (**Figure 2B**).

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, l'anion superoxyde O<sub>2</sub><sup>-</sup>, 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pouvant lui même être converti par la suite en ion hydroxyl OH<sup>-</sup> hautement réactif (St-Pierre et al, 2002). Ces intermédiaires, connus sous le nom de radicaux libres ou ROS (Réactive oxygene species), sont toxiques pour la cellule, générant des dommages notamment envers l'ADNmt, localisé en première ligne à proximité de la membrane interne de la mitochondrie.



**Figure 3: Taille et capacité codante de différents génomes mitochondriaux comparés à celui de l' $\alpha$  protéobactérie Rickettsia. Adapté de (Gray, 1999)**

Les cercles et les lignes représentent les formes des génomes. Pour les génomes de taille supérieure à 60kDa, le rouge correspond à la proportion des gènes à la fonction identifiée, le bleu à la proportion des régions intergéniques.

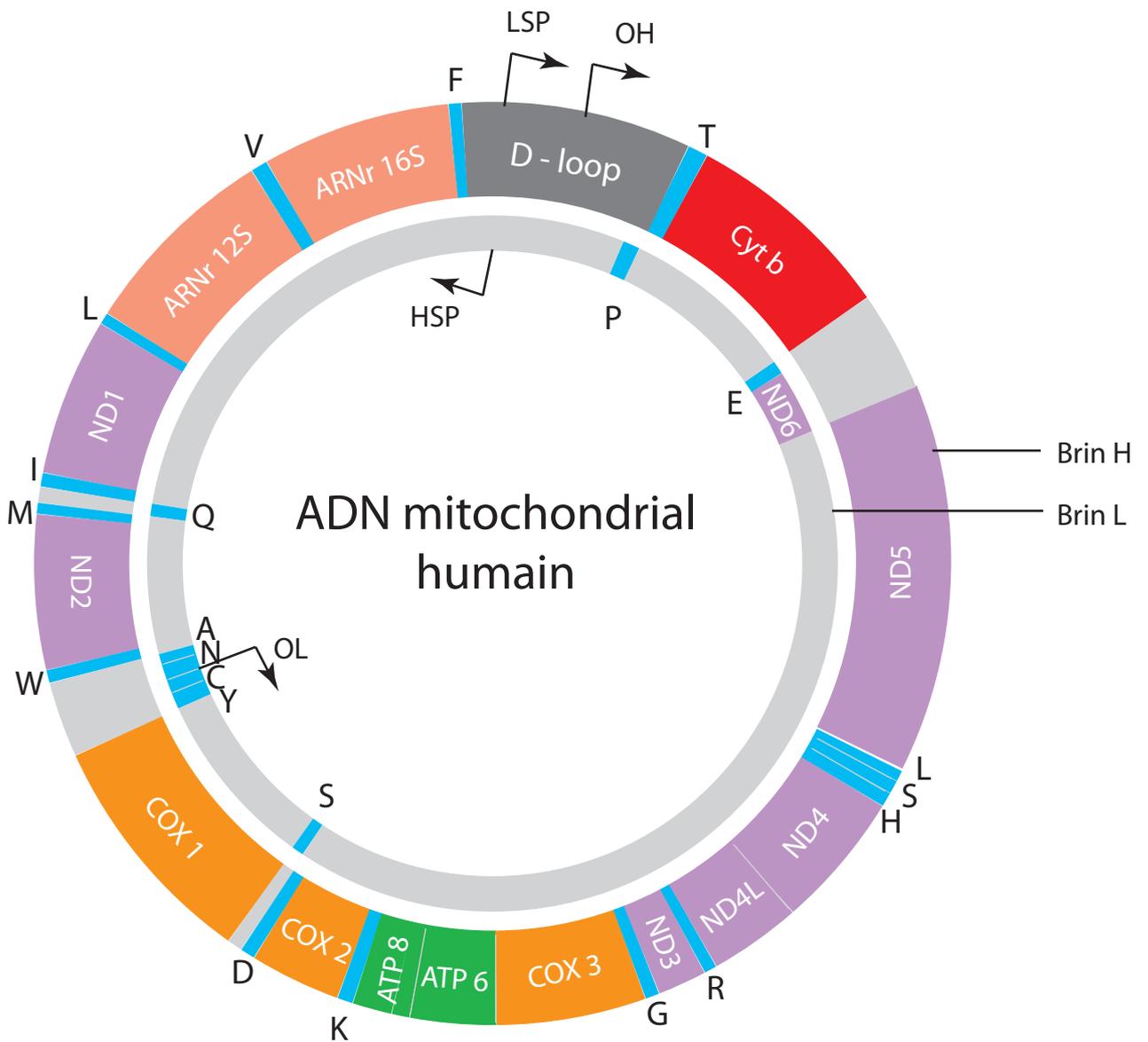
Produit	Nombre de gènes				
	Plante <i>Arabidopsis thaliana</i>	Animal <i>Homo sapiens</i>	Champignon <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Protiste <i>Reclinomonas americana</i>	Algue verte <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
Complexe I (NADH déshydrogénase)	9	7	0	12	5
Complexe II (Succinate déshydrogénase)	1	0	0	3	0
Complexe III (Cytochrome c réductase)	1	1	1	1	1
Complexe IV (Cytochrome c oxydase)	3	3	3	3	1
Complexe V (ATP synthase)	5	2	3	5	0
Biogénèse cytochrome c	4	0	0	5	0
Protéines ribosomales	7	0	1	27	0
ARNr	3	2	2	3	2
ARNt	22	22	24	26	3
Gène intronique (maturase)	1	0	0	0	1
ARN polymérase	0	0	0	4	0
Composant ARN de la RNase P	0	0	1	1	0
Import de protéines	0	0	0	1	0
Facteurs d'élongation	0	0	0	1	0
Total (ORF exclues)	57	37	35	97	13

**Tableau 1: Comparaison du nombre de protéines codées par les génomes mitochondriaux de divers organismes. Adapté de (Unsold et al, 1997)**

### 3 Génétique mitochondriale

#### 3.1 Diversité des génomes mitochondriaux

Les mitochondries et les chloroplastes des plantes sont les seuls organites en dehors du noyau à posséder leur propre ADN. Dès les années 50, des études chez la levure avaient montré que la transmission de certains caractères mitochondriaux n'obéissait pas aux lois de Mendel et c'est en 1963 que fut pour la première fois mis en évidence l'existence du génome mitochondrial (Nass & Nass, 1963). L'explication de l'existence de ce 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 primitive, procurant à cette dernière un formidable avantage évolutif (Sagan, 1967). Cette théorie, dite endosymbiotique, fut d'abord très contestée pour être aujourd'hui largement acceptée car étayée par de multiples analyses biochimiques et génétiques. Le séquençage massif des génomes mitochondriaux a permis de mettre en évidence qu'entre le génome de l' $\alpha$  protéobactérie *Rickettsia prowasekii* et celui de l'ADNmt, une perte ainsi qu'un transfert de gènes vers le génome nucléaire avaient eu lieu au cours de l'évolution, rendant la mitochondrie totalement dépendante du noyau. Le séquençage de l'ADNmt a également montré que ce dernier avait évolué de façon différente selon l'organisme qui l'abritait. L'ADNmt peut ainsi être de forme circulaire ou linéaire, simple ou double brin et avoir une taille pouvant aller de 6 kilopaires de bases (kb) chez *Plasmodium falciparum* à plus de 2000 kb chez certaines plantes terrestres (**Figure 3**). Ces différences de taille ne sont de plus pas forcément corrélées à la capacité codante des génomes. Pour ne citer qu'un exemple le génome mitochondrial d'*Arabidopsis thaliana*, codant pour 57 gènes, est plus grand que le génome mitochondrial de *Reclinomonas americana* codant lui pour 97 gènes (**Tableau 1**) (Burger et al, 2003).



**Figure 4: Le génome mitochondrial humain. Adapté de (Zeviani et al, 2004)**

Les gènes des sous-unités du complexe I sont en violet, celui du complexe III en rouge, ceux du complexe IV en orange et ceux du complexe V en vert. Les gènes des ARNr sont en bleu et ceux des ARNt en rose.

Codon	Mitochondrie humaine	Code universel
TGA	Trp	Stop
ATA	Met	Ile
AGA	Stop	Arg
AGG	Stop	Arg

**Tableau 2: Différences entre le code génétique des mitochondries humaines et le code génétique universel**

### 3.2 Le génome mitochondrial humain

Premier génome mitochondrial à avoir été séquencé, l'ADNmt humain est quant à lui relativement petit puisqu'il n'est composé que de 16569 bases (Anderson et al, 1981). De forme circulaire, il est constitué de deux brins superenroulés de densités différentes sur gradient de chlorure de césium: le brin lourd H (pour Heavy) car riche en GC et le brin léger L (pour Light) car riche en AT. Très compact et sans intron, l'ADNmt ne contient que deux régions non codantes, la région NCR de 1,1 kb (Non coding region) et l'origine de réplication du brin L. Le reste de l'ADNmt correspond à 37 gènes contigus les uns aux autres, codant pour 22 ARN de transfert, 2 ARN ribosomiaux 12S et 16S et 13 protéines essentielles à la chaîne respiratoire (**Figure 4**).

L'ADNmt est donc entièrement dévolu à la production de ces 13 protéines. Pour ce faire, la mitochondrie a toutefois besoin d'en importer une kyrielle d'autres du cytoplasme, nécessaires à la réplication, la transcription et la maintenance de l'ADNmt ainsi qu'à la traduction de ses transcrits. Trois hypothèses pourraient expliquer la rétention surprenante de ces quelques gènes mitochondriaux au cours de l'évolution. La première repose sur le fait que l'import de ces protéines à travers les membranes de la mitochondrie serait rendu difficile par leur grande hydrophobicité. Ainsi, les gènes de la sous unité 1 de la cytochrome c oxydase et celui du cytochrome b, conservés dans tous les génomes mitochondriaux séquencés, sont les protéines les plus hydrophobes de la mitochondrie (Claros et al, 1995). La deuxième cause avancée serait que le transfert de ces gènes pourrait être entravé par la différence de code génétique entre l'ADNmt et l'ADN nucléaire, engendrant une potentielle perte de fonction de la protéine s'il avait eu lieu (**Tableau 2**). Enfin, la troisième hypothèse évoquée serait que la régulation de l'expression des gènes mitochondriaux opérée par le noyau serait importante pour le contrôle du métabolisme de la cellule (Allen, 1993; de Grey, 2005).

### 3.3 Organisation de l'ADN mitochondrial humain en nucléoïde

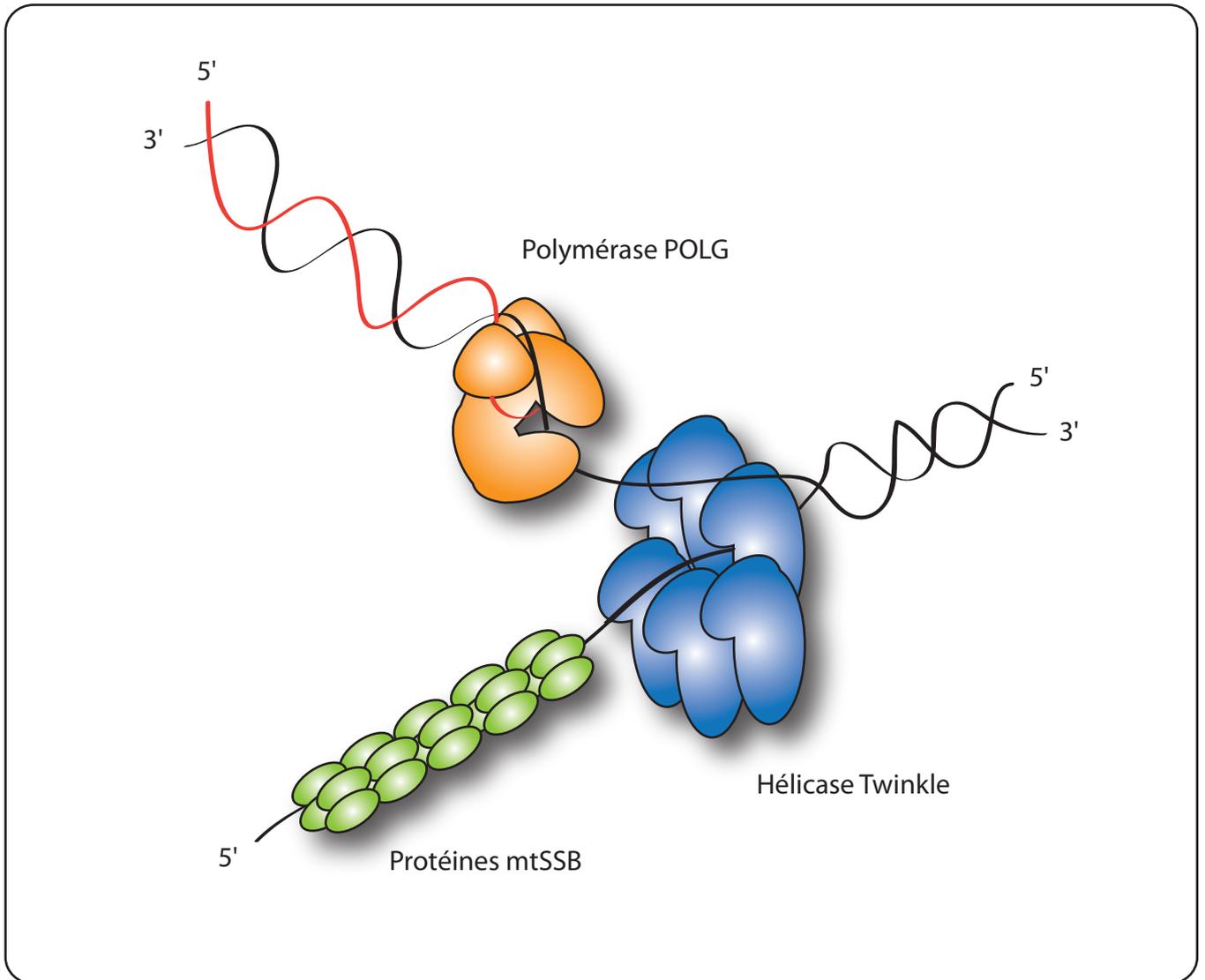
L'ADNmt, contrairement à ce qu'il a été longtemps pensé, n'est pas « nu » dans les mitochondries. Il est compris dans une structure appelée nucléoïde de 70nm de diamètre regroupant de 2 à 10 copies d'ADNmt associées à plusieurs protéines (Iborra et al, 2004; Legros et al, 2004). La plupart des connaissances actuelles sur les nucléoïdes sont basées sur des études faites sur la levure *S. cerevisiae* chez qui il est relativement aisé d'obtenir des mutants et d'observer l'ADNmt par microscopie. La principale protéine associée à l'ADNmt de la levure est une protéine du groupe des protéines HMG (High mobility group) nommée AbF2 et ayant pour homologue humain le facteur de transcription TFAM (Alam et al, 2003). Outre la protéine TFAM, essentielle pour la maintenance et la régulation du nombre de copies de l'ADNmt, les nucléoïdes humains contiendraient également les protéines de la réplication que sont l'hélicase Twinkle, les protéines SSB (Single Strand DNA Binding Protein) et la polymérase POLG. Plusieurs autres protéines impliquées dans diverses fonctions, notamment métaboliques, ont été trouvées comme co-purifiant avec l'ADNmt mais leur lien avec le nucléoïde reste à vérifier. Récemment, une nouvelle protéine semblant jouer un rôle important dans cette structure a été identifiée : ATAD3, une protéine de la famille des ATPases. Il a été montré qu'un knock down de cette protéine dans les cellules humaines entraînait une soudaine diminution du nombre de nucléoïdes. La protéine ATAD3 se fixerait au niveau de la région non codante de l'ADNmt permettant de lier ensemble les molécules d'ADNmt (He et al, 2007).

D'un point de vue fonctionnel, le nucléoïde représente l'unité de ségrégation de l'ADNmt. Il jouerait également un rôle dans sa protection ainsi que dans l'orchestration des mécanismes de la réplication, de la transcription et de la réparation. La traduction des protéines mitochondriales se ferait quant à elle dans l'environnement proche du nucléoïde localisé à proximité de la membrane interne, permettant aux protéines naissantes d'être immédiatement incorporées dans les complexes de la chaîne respiratoire (Bogenhagen et al, 2008).

### 3.4 Transcription

La transcription de l'ADNmt humain débute au niveau de la région non codante NCR de l'ADNmt qui contient le promoteur du brin H HSP (Heavy strand promoter) et celui du brin L LSP (Light strand promoter). La synthèse de l'ARN est réalisée par la polymérase MTRPOL (Mitochondrial RNA polymerase) composée d'une seule sous unité de 120 kDa et partageant des similarités de séquence avec les polymérases des bactériophages T3 et T7. Si la polymérase reconnaît spécifiquement les promoteurs HSP et LSP, l'initiation de la transcription ne peut se faire qu'en présence des facteurs de transcription TFAM (Mitochondrial transcription factor A) et TFB2M (Mitochondrial transcription factor B) (Gaspari et al, 2004). La transcription du brin H débute en deux sites très proches l'un de l'autre nommés HSP1 et HSP2 générant deux types de transcrits polycistroniques (Montoya et al, 1982). Le promoteur HSP1 se situe en amont du gène de l'ARNt<sup>Phe</sup> et génère un transcrit tronqué composé des gènes des deux ARNr, de l'ARNt<sup>Phe</sup> et de l'ARNt<sup>Val</sup>. Ce transcrit tronqué est la conséquence de la fixation du facteur de terminaison de la transcription mTERF (Mitochondrial transcription termination factor) au niveau du gène de l'ARNt<sup>Phe</sup> et à une autre position en aval des deux gènes des ARNr, générant une boucle dans l'ADN (Martin et al, 2005). L'initiation à partir du promoteur HSP1 est environ 20 fois plus fréquente qu'à partir de HSP2. La transcription débutant au niveau de ce dernier génère quant à lui un transcrit comportant la totalité de l'information du brin H (Montoya et al, 1982). Le promoteur LSP situé à 150 bases de HSP1 initie quant à lui la synthèse d'un seul transcrit comportant 8 ARNt et un ARNm (Fernandez-Silva et al, 2003).

La maturation de ces différents ARN repose sur le clivage des ARNt. En effet, ces derniers sont disposés de façon à être contigus à chaque ARN messager et ribosomique. C'est leur repliement en ARNt qui engendrerait leur clivage par les RNase P et Z permettant la production des différents ARN (Ojala et al, 1981). Les ARNm sont ensuite polyadénylés en 3' et les ARNt subissent des modifications post transcriptionnelles sur certaines de leur bases et sont maturés par addition de CCA en 3'.



**Figure 5: Les protéines de la réplication de l'ADNmt.**

Le nouveau brin d'ADN en cours de synthèse est en rouge. Adapté de (Falkenberg et al, 2007)

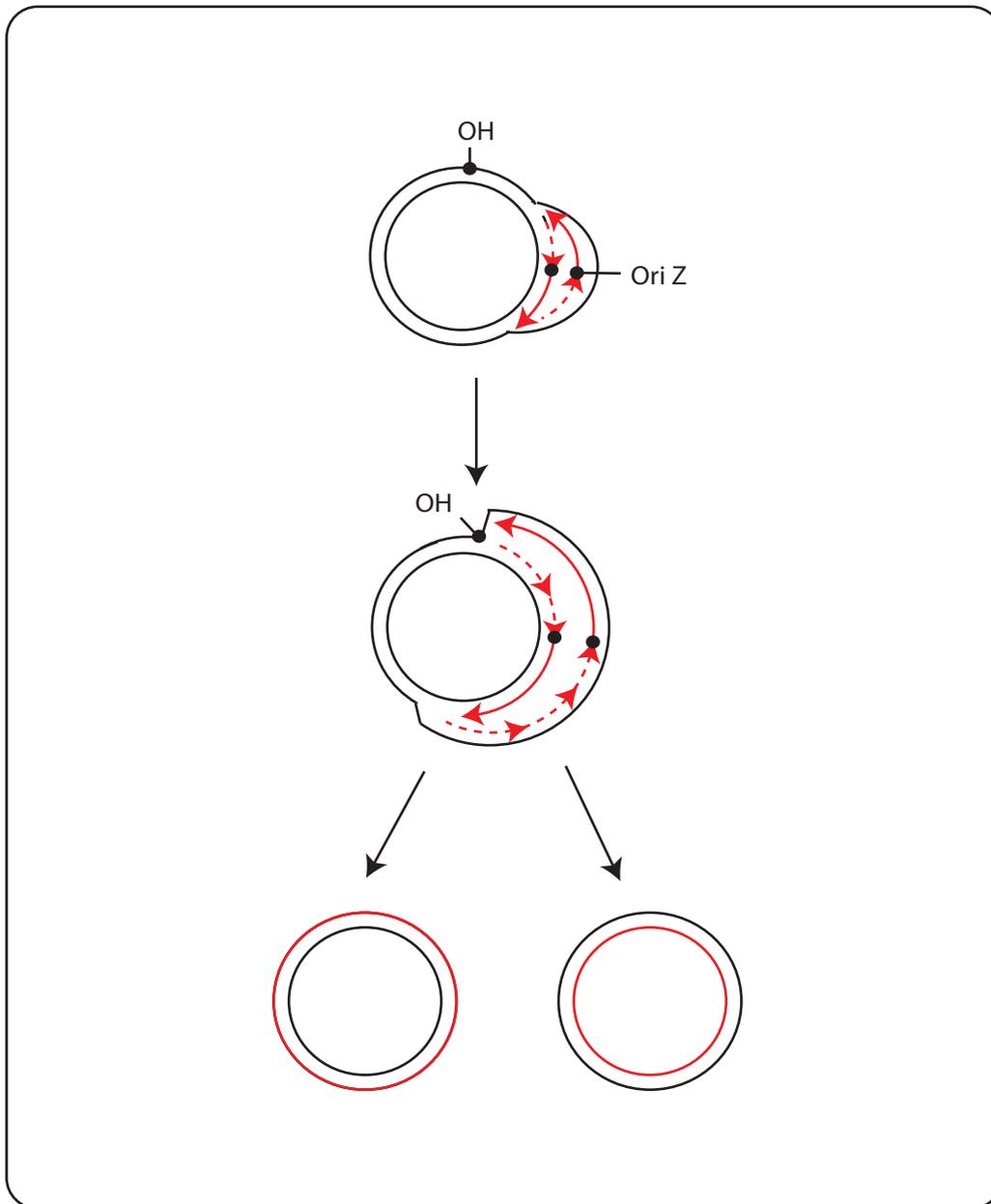
## 3.5 Réplication

### 3.5.1 Protéines de la réplication

Le réplisome minimal nécessaire à la réplication de l'ADNmt a pu être reconstitué *in vitro*, se montrant capable de synthétiser un brin d'ADNmt d'une longueur de 16 kb avec une vitesse de 180 pb par minute (Korhonen et al, 2004). Il est composé de trois protéines (**Figure 5**) :

L'ADN polymérase  $\gamma$  ou POLG est un hétérotrimère composé de la sous unité catalytique POLG1 de 140 kDa et deux de sous unités processives POLG2 de 55 kDa. Elle synthétise l'ADN complémentaire au brin parental et est dépendante d'une amorce ARN. Elle possède également une activité exonucléase 3'-5' et 5'-deoxyribose phosphate lyase (Kaguni, 2004). Les protéines de liaison à l'ADN simple brin mtSSB (Mitochondrial single strand DNA-binding protein) possèdent un domaine N-terminal similaire aux SSB procaryotiques. Elles lient l'ADN simple brin l'empêchant ainsi de se réappairier à son brin complémentaire en formant des tétramères de 56 kDa recouvrant entre 8 et 17 nucléotides (Kaguni, 2004). Elles stimulerait également l'activité de la polymérase POLG et l'hélicase Twinkle (Korhonen et al, 2003). L'hélicase Twinkle est un hexamère qui ressemble à l'hélicase du phage T7. Elle sépare les deux brins de l'ADN avant le passage de la polymérase dans le sens 5'-3' (Spelbrink et al, 2001).

A ces protéines essentielles s'ajoutent les topoisomérases qui déroulent l'ADNmt superenroulé. L'activité primase produisant les amorces ARN serait quant à elle endossée par la polymérase MTRPOL (Fuste et al, 2010; Wanrooij et al, 2008). Il est enfin intéressant de noter que plusieurs composants des machineries de la réplication et de la transcription montrent des similarités avec leurs homologues phagiques, laissant supposer qu'un phage de type T aurait également pris part à l'évènement d'endosymbiose (Shutt & Gray, 2006).



**Figure 6: Mode de répllication de l'ADNmt synchronisé.**

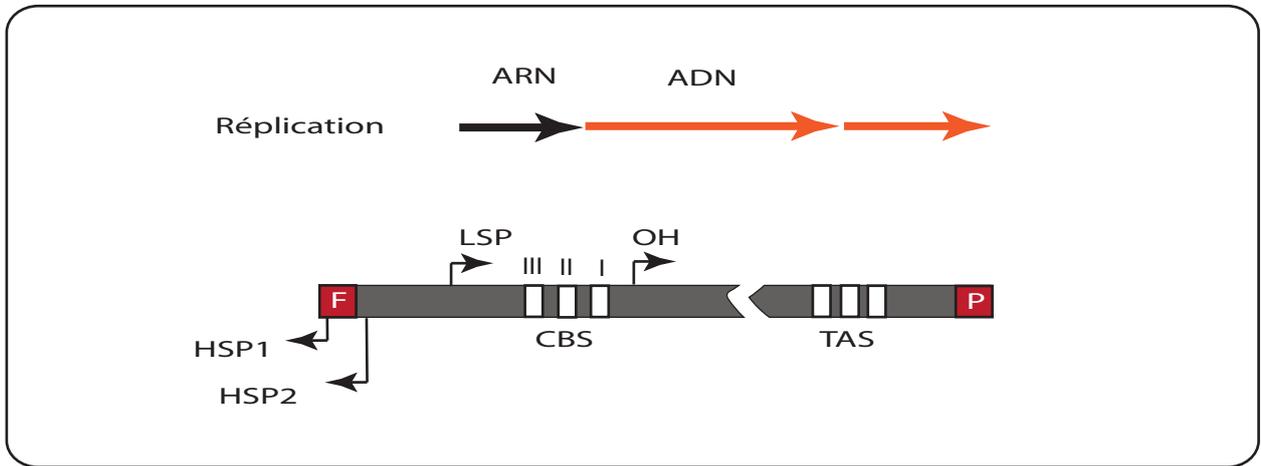
Les brins néosynthétisés sont indiqués en rouge. Les fragments d'ADN synthétisés en continu sont en trait plein et les fragments d'Okazaki en pointillés.

### 3.5.2 Les mécanismes de la réplication

A ce jour, le mécanisme exact de la réplication de l'ADNmt chez les mammifères n'est pas totalement élucidé. En effet, si pendant plusieurs décennies le modèle qui a prévalu fut celui dit non synchrone décrit par Clayton dès 1972 (Robberson & Clayton, 1972), celui-ci a été remis en cause en 2000 par des études décrivant un mode de réplication synchronisé (Holt et al, 2000). Depuis, le mode de réplication de l'ADNmt fait l'objet d'un féroce débat, chaque modèle étant chacun à son tour depuis dix ans étayé de nouvelles données reposant chacun sur des méthodologies différentes.

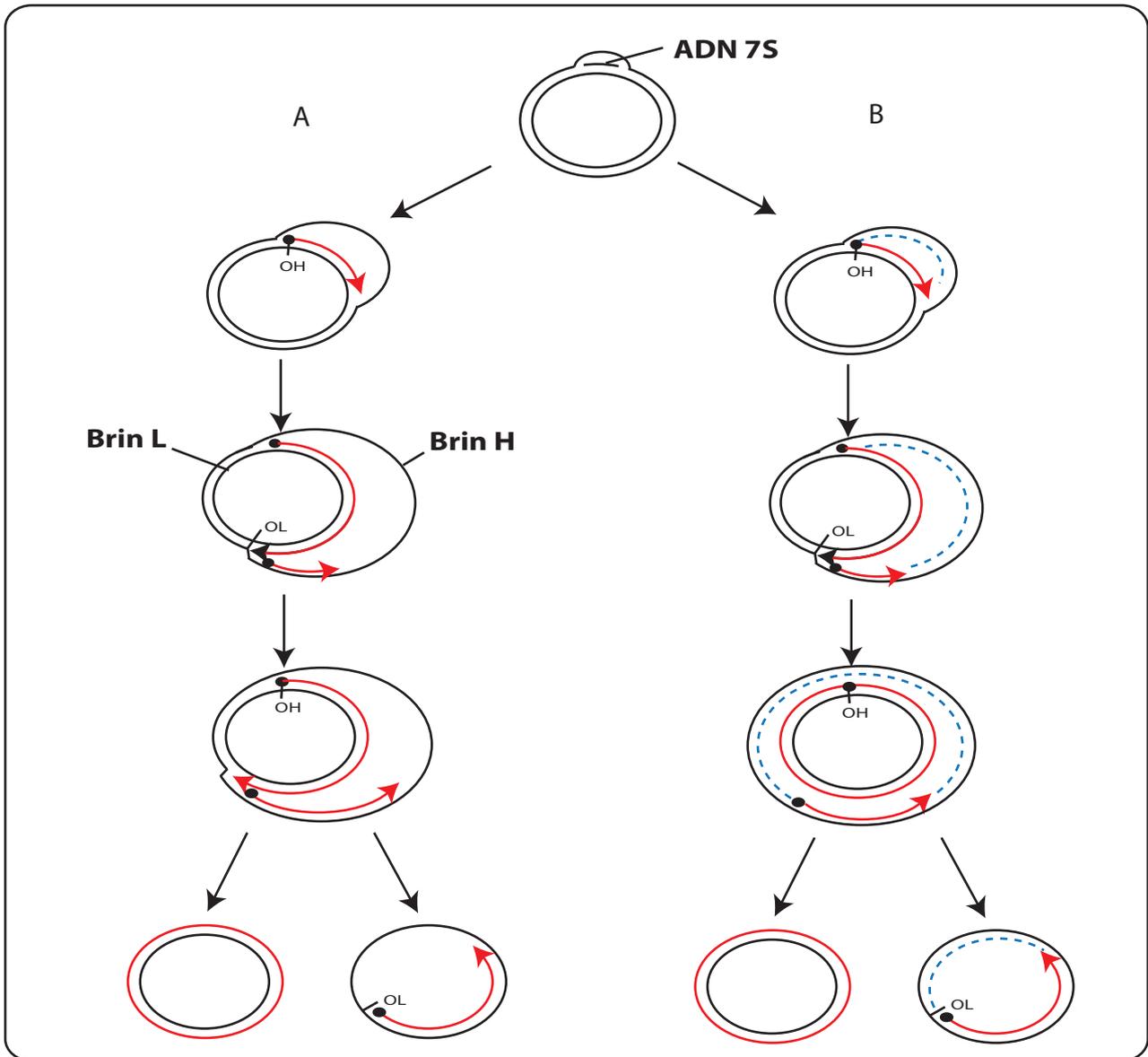
#### *Mode de réplication synchronisé*

Dans ce modèle la réplication des deux brins est décrite comme se faisant d'une façon similaire à celle de l'ADN nucléaire à savoir de façon bidirectionnelle et synchronisée. Ce mode de réplication a d'abord été formulé après l'observation de la présence d'intermédiaires de la réplication double brin à l'aide d'une technique ayant servi à élucider les mécanismes de la réplication nucléaire. Cette technique, appelée électrophorèse sur gel d'agarose en deux dimensions (2D-AGE), sépare les fragments d'ADN en première dimension selon leur taille et en seconde dimension selon leur conformation. Il est alors possible de distinguer différents types d'intermédiaires de la réplication, ceux double brins résultant du modèle synchronisé devant former une structure appelée « arc  $\gamma$  ». De telles structures ayant été observées entre les origines de réplication du brin H (OH) et du brin L (OL), il en a été conclu que la réplication se faisait de façon bidirectionnelle et débutait sur une large zone dénommée OriZ comprenant les gènes du cytochrome c, NAD5 et NAD6. Les deux fourches de réplication s'arrêteraient à l'origine de réplication OH (Bowmaker et al, 2003) ( **Figure 6**).



**Figure 7: Représentation schématique de la région non codante. Adapté de (Falkenberg et al, 2007).**

La flèche noire correspond à l'ARN, les flèches oranges à l'ADN.



**Figure 8: Mode de réplcation non synchronisé et unidirectionnel. Adapté de (Wanrooij et al, 2010)**

A) Modèle de Clayton, le brin H est recouvert de mtSSB.

B) Modèle RITOLS, le brin H est recouvert d'ARN. Les brins d'ADN néosynthétisés sont en rouge.

Les fragments d'ARN du modèle RITOLS sont en bleu.

***Mode de réplication non synchrone***

Dans ce modèle la synthèse de chacun des deux brins de l'ADNmt se fait de façon unidirectionnelle et non synchronisée à partir de deux origines de réplication distinctes. La réplication débute par la synthèse du brin H dit précoce au niveau de l'origine de réplication OH à partir d'une amorce ARN synthétisée par la polymérase ARN MTRPOL (Chang & Clayton, 1985). La transition ARN/ADN a été identifiée comme se trouvant au niveau de trois séquences conservées chez les vertébrés, les séquences CBS (**Figure 7**). Le mode de production de l'amorce ARN n'est pas totalement élucidé et se ferait soit de façon séquence-dépendante au niveau de CSBII (qui jouerait le rôle de terminateur de la transcription) soit par clivage du transcrit par la RNase MRP. La fourche de réplication s'arrête ensuite au niveau d'une séquence de 15 pb dénommée TAS (termination-associated sequence) créant un brin d'ADN appelé 7S DNA et une région triple brin recouvrant 650 pb, la boucle de déplacement D. Cet arrêt pourrait être un point de régulation de la réplication (Falkenberg et al, 2007). La synthèse du brin précoce continue ensuite sur deux tiers du génome déplaçant le brin parental H restant simple brin. Ce dernier serait au fur et à mesure recouvert par les protéines mtSSB. Lorsque la fourche de réplication arrive au niveau de l'origine de réplication OL, celle-ci en devenant simple brin adopte une structure en épingle à cheveu (Martens & Clayton, 1979). Cette conformation partiellement double brin serait reconnue spécifiquement par la polymérase ARN qui synthétiserait une amorce ARN au niveau de la région simple brin de OL, initiant la synthèse du brin L tardif dans la direction opposée (**Figure 8A**) (Fuste et al, 2010). Ce modèle a été révisé en proposant la présence d'origines de réplication OL alternatives entre OL et la boucle D (Brown et al, 2005).

A côté de ce modèle un deuxième, nommé RITOLS (Ribonucleotide incorporated throughout the lagging strand), fut ensuite décrit (Yasukawa et al, 2006) Ce modèle, qui repose sur l'observation que certains intermédiaires double brins de la réplication sont sensibles à la RNase H, ressemble au modèle non synchronisé de Clayton à ceci près que le brin parental H serait recouvert de fragments d'ARN au lieu de protéines SSB (**Figure 8B**). Il a été proposé que les intermédiaires simples brins observés par Clayton pourraient simplement avoir perdu l'ARN au cours de leur extraction. Le mécanisme de formation de ces ARN ainsi que celui de leur conversion en ADN reste à ce jour inconnu.

Pour résumer il y a donc deux modèles de réplication différents décrits dans la littérature, reposant chacun sur un solide faisceau de preuves. En conséquence, l'opinion actuelle considère qu'il ne serait pas improbable que différents modes de réplication existent

en fonction des tissus ou du métabolisme comme cela a déjà été démontré chez d'autres organismes comme le bactériophage T4 (Kreuzer, 2000). Il a été proposé que le mode de réplication RITOLS pouvait prévaloir dans les cellules en situation normale tandis que le mode de réplication synchronisé pourrait avoir lieu dans les cellules requérant une synthèse d'ADN rapide, par exemple en réponse à une baisse de l'ADNmt induite par des agents chimiques comme le BET (Yasukawa et al, 2005), par une surexpression de la protéine TFAM (Pohjoismaki et al, 2006) ou par un mutant de l'hélicase Twinkle (Wanrooij et al, 2007).

### 3.6 Réparation

Alors qu'il a longtemps été admis que le système de réparation de l'ADNmt était limité, cette hypothèse est actuellement en cours de révision, un nombre croissant de protéines impliquées dans la réparation de l'ADNmt ayant été reporté dernièrement dans la littérature (Liu & Demple, 2010). Il existe tout d'abord un système d'excision de bases endommagées par oxydation, alkylation ou par hydrolyse. La réparation débute par une ADN glycosylase qui enlève la base suivie d'une enzyme Ape1 générant une extrémité 3'OH et 5'phosphate de part et d'autre du site abasique. L'extrémité 3'OH sert ensuite d'amorce à la polymérase  $\gamma$  insérant un nouveau nucléotide et enlevant le phosphate du résidu en 5' par son activité lyase. Les deux nucléotides contigus sont ensuite liés par l'ADN ligase III. La mitochondrie posséderait également un système de réparation des mismatch ainsi qu'un système éliminant les dNTP mutés avant qu'ils ne soient incorporés dans l'ADN. Lorsque les mutations ne sont pas réparables, il semblerait que la mitochondrie opère à une dégradation de l'ADNmt. Une diminution de son nombre de molécules est en effet observée lorsque les cellules sont exposées aux UV induisant des dimères de pyrimidine, à des mutagènes comme le bromure d'ethidium ou à des enzymes de restriction importées artificiellement dans la mitochondrie créant des cassures doubles brin dans l'ADNmt. Il a été postulé que ces mutations génèreraient un arrêt des polymérases mitochondriales ce qui pourrait déclencher le signal de dégradation. Ce mécanisme de dégradation reste toutefois à ce jour inconnu mais impliquerait des endonucléases ou une dégradation de l'ensemble de la mitochondrie par mitophagie, processus qui consiste en la séquestration de la mitochondrie dans un autophagosome suivie de sa dégradation par fusion à des lysosomes (Kim et al, 2007).

Malgré l'existence de ces différents systèmes de réparation, il a été estimé que le génome mitochondrial avait un taux de mutation environ 10 à 20 fois supérieur à celui du génome nucléaire (Yakes & Van Houten, 1997). Il est probable que ce niveau de mutation élevé soit dû au fait que l'ADNmt soit sans cesse soumis aux radicaux libres produits par la chaîne respiratoire. Les mutations, en s'accumulant avec l'âge, induiraient une baisse de fonctionnement de cette dernière engendrant une augmentation de la production de ROS, aboutissant ainsi à la création d'un cercle vicieux. Il n'est donc pas étonnant qu'un nombre croissant de mutations somatiques dans l'ADNmt 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 Parkinson et Alzheimer (Wallace, 2005). Si ces mutations somatiques ne semblent toutefois pas être la cause primaire de toutes ces maladies, d'autres types de mutations, le plus souvent héréditaires, ont par contre été décrites comme étant la cause directe d'un dysfonctionnement de la mitochondrie, conduisant à des maladies dénommées mitochondriales.

## II Les maladies mitochondriales

### 1 Présentation générale

Le premier cas de maladie mitochondriale a été décrit par Luft en 1962 chez une patiente souffrant d'une dérégulation sévère du métabolisme et possédant des mitochondries à l'aspect anormal (Luft et al, 1962). Depuis, leur nombre n'a cessé d'augmenter. Malgré leur multiplicité, les maladies mitochondriales font toutefois partie de la classe des maladies dites rares, plusieurs études épidémiologiques réalisées dans différents pays reportant une prévalence d'environ 1 sur 5000 (Schaefer et al, 2004). Il est cependant fort probable que ce chiffre soit largement sous estimé de par la difficulté de diagnostiquer ce type de pathologies. En effet, le seul dénominateur commun qui les relie est un déficit de la chaîne respiratoire. On aurait pu penser d'un premier abord que la baisse en ATP qui en résulte ainsi que le caractère ubiquitaire des mitochondries induirait un phénotype relativement similaire d'un patient à un autre mais il n'en est rien, bien au contraire.

Le tableau clinique présenté par les maladies mitochondriales est extraordinairement varié. Les atteintes peuvent être multiviscérales comme ne toucher qu'un organe isolé. Les plus affectés sont généralement les plus demandeurs en énergie tels que le cœur, les muscles squelettiques, le système nerveux et sensoriel, les reins et les systèmes endocriniens engendrant principalement des myopathies et des neurodégénérescences mais également de multiples autres symptômes. Tous ces syndromes peuvent survenir de la vie intra utérine jusqu'à un âge adulte tardif.

De par la double origine génétique de la chaîne respiratoire, les mutations engendrant des maladies mitochondriales peuvent être d'origines soit nucléaire soit mitochondriale. Les mutations du génome nucléaire sont transmises selon un mode classique c'est-à-dire mendélien avec un mode de transmission soit de type autosomique dominant ou récessif soit lié au chromosome X. Les mutations du génome mitochondrial sont quant à elles transmises exclusivement par la mère, les mitochondries du spermatozoïde du père étant détruites par ubiquitinylation lors de la fécondation (Sutovsky et al, 1999). Des mutations sporadiques dans l'ADNmt peuvent également se produire au début de l'embryogénèse.

Les syndromes associés aux maladies mitochondriales décrites dans la littérature sont le résultat du recensement d'un certain nombre de symptômes observés chez la plupart des patients, et souvent accompagnés de manifestations cliniques facultatives. Leur classification est rendue difficile car elle peut se faire sur la base de différentes caractéristiques (Manifestations cliniques, type de mutation, mode de transmission...). Celle proposée ci-dessous reposant sur l'origine nucléaire ou mitochondriale des mutations il convient de préciser qu'un même syndrome pourra être retrouvé dans les deux classes, des mutations d'origine différentes pouvant engendrer des symptômes similaires. De même, cette classification ne se prétend pas exhaustive et seules les maladies les plus fréquentes et les mieux caractérisées seront présentées, une liste complète se trouvant sur le site MITOMAP (MITOMAP : A human mitochondrial genome database ; <http://www.mitomap.org>).

## **2 Maladies liées à des mutations dans l'ADN mitochondrial**

### **2.1 Caractéristiques générales**

On estime qu'environ 20% des maladies mitochondriales sont dues à des mutations dans l'ADNmt (Kirby & Thorburn, 2008). La première, correspondant à une délétion, a été décrite en 1988 par Holt chez un patient atteint d'une myopathie (Holt et al, 1988). Durant les dix années qui suivirent de nouvelles mutations furent décrites à un rythme d'environ dix par an. A ce jour on en dénombre plus de 200 correspondant à des mutations ponctuelles et à des réarrangements. La gravité des maladies liées à ce type de mutations ainsi que leur distribution tissulaire peuvent varier énormément d'un patient à un autre, même chez ceux faisant partie de la même famille. Cette surprenante hétérogénéité trouve partiellement son explication en l'existence de trois phénomènes associés à la génétique particulière de l'ADNmt : celui de l'hétéroplasmie, de la ségrégation mitotique et enfin du « bottleneck ».

### **2.1.1 L'hétéroplasmie**

Contrairement au génome nucléaire, l'ADNmt est présent en millier d'exemplaires dans la cellule. Dans une situation normale toutes ces copies sont identiques créant un état d'homoplasmie. Par contre, en cas de mutation dans l'ADNmt, celui-ci pourra coexister avec des copies d'ADNmt sauvage. Cette situation, dite hétéroplasmie, est présente chez la majorité des patients. Selon le taux d'ADNmt sauvage dans la cellule, celui-ci suffira plus ou moins à pallier aux déficits causés par l'ADNmt muté. Il existe toutefois un niveau seuil au-dessus duquel les symptômes apparaissent inexorablement. Ce seuil est d'environ 60% mais peut varier en fonction du type cellulaire, de sa demande en énergie et du contexte nucléaire, donc du patient.

### **2.1.2 La ségrégation mitotique**

Lors de chaque division mitotique, les mitochondries sont distribuées au hasard dans les cellules filles ce qui est susceptible de changer le taux d'hétéroplasmie de la cellule et, au cours des divisions successives, de changer le taux d'hétéroplasmie d'un tissu. Ainsi, un enfant naissant sain mais porteur d'une mutation dans l'ADNmt est susceptible de présenter soudainement des symptômes à n'importe quel âge de sa vie, symptômes évoluant souvent par la suite vers une atteinte généralisée. Une étude récente recherchant systématiquement la présence de 10 mutations connues dans l'ADNmt dans le sang de 3000 cordons ombilicaux a abouti au résultat surprenant que près d'un nouveau né sur 200 serait porteur d'une mutation potentiellement pathologique (Elliott et al, 2008). Cette étude laisse à penser qu'une grande partie de la population serait susceptible de développer un jour une maladie mitochondriale, cette probabilité restant toutefois très mince dans la majorité des cas du fait que la mutation soit présente à un niveau d'hétéroplasmie extrêmement faible. Si le taux d'hétéroplasmie varie d'un organe à un autre, c'est également dû à la ségrégation mitotique se déroulant lors des premiers stades de l'embryogenèse aboutissant au développement de tissus avec un spectre d'hétéroplasmie varié. Deux patients avec la même mutation peuvent donc être atteints de maladies différentes selon que cette dernière soit présente dans tel ou tel tissu avec tel ou tel niveau d'hétéroplasmie.

### **2.1.3 La théorie du bottleneck.**

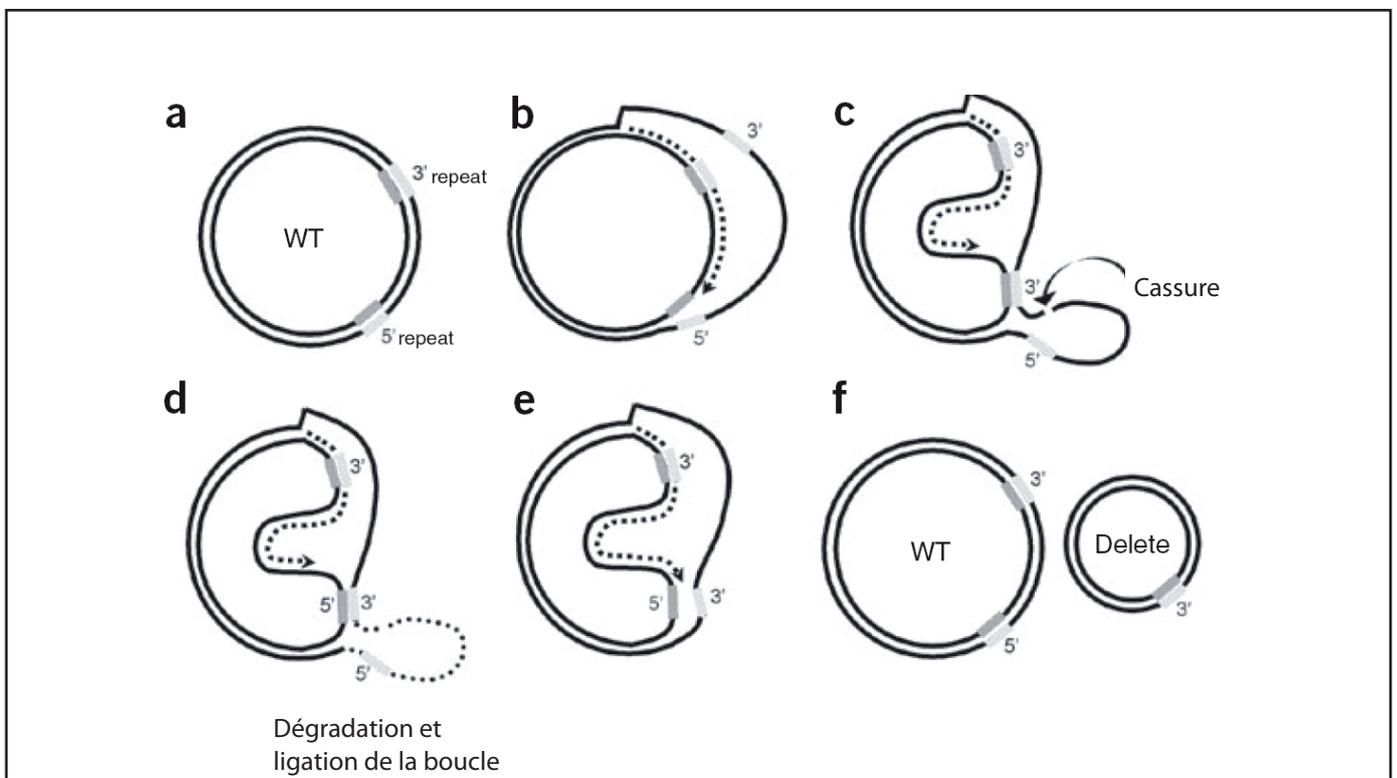
Il est souvent constaté que les membres d'une même famille porteurs de molécules d'ADNmt mutés présentent des phénotypes différents que se soit entre la mère et ses enfants ou entre les enfants eux-mêmes, avec de plus un retour possible à un état d'homoplasmie. De ce constat est née l'hypothèse de l'existence d'un goulot d'étranglement génétique ayant lieu lors de la formation des cellules germinales. Le mécanisme de ce « genetic bottleneck » a fait l'objet d'un intense débat ces dernières années et n'est toujours pas totalement compris.

La première hypothèse postule que lors du développement de l'embryon, un phénomène de réduction puis d'amplification de l'ADNmt se produirait lors de la formation des lignées germinales. Les cellules germinales primordiales ne contiendraient qu'une dizaine de molécules d'ADNmt alors que les ovocytes en fin de croissance en contiennent jusqu'à 200 000. Selon le type d'ADNmt sélectionné lors de ce goulot d'étranglement génétique, les ovocytes auront donc un taux d'hétéroplasmie différent (Cree et al, 2008). La seconde hypothèse suppose quant à elle que le bottleneck se produirait sans réduction du nombre d'ADNmt dans les lignées germinales mais par la réplication d'une sous population d'ADNmt durant l'ovogenèse (Cao et al, 2007). Finalement, une troisième hypothèse a été récemment postulée, décrivant elle aussi la réplication d'une sous population d'ADNmt mais cette fois ci pendant la folliculogénèse postnatale (Wai et al, 2008).

## **2.2 Types de mutations**

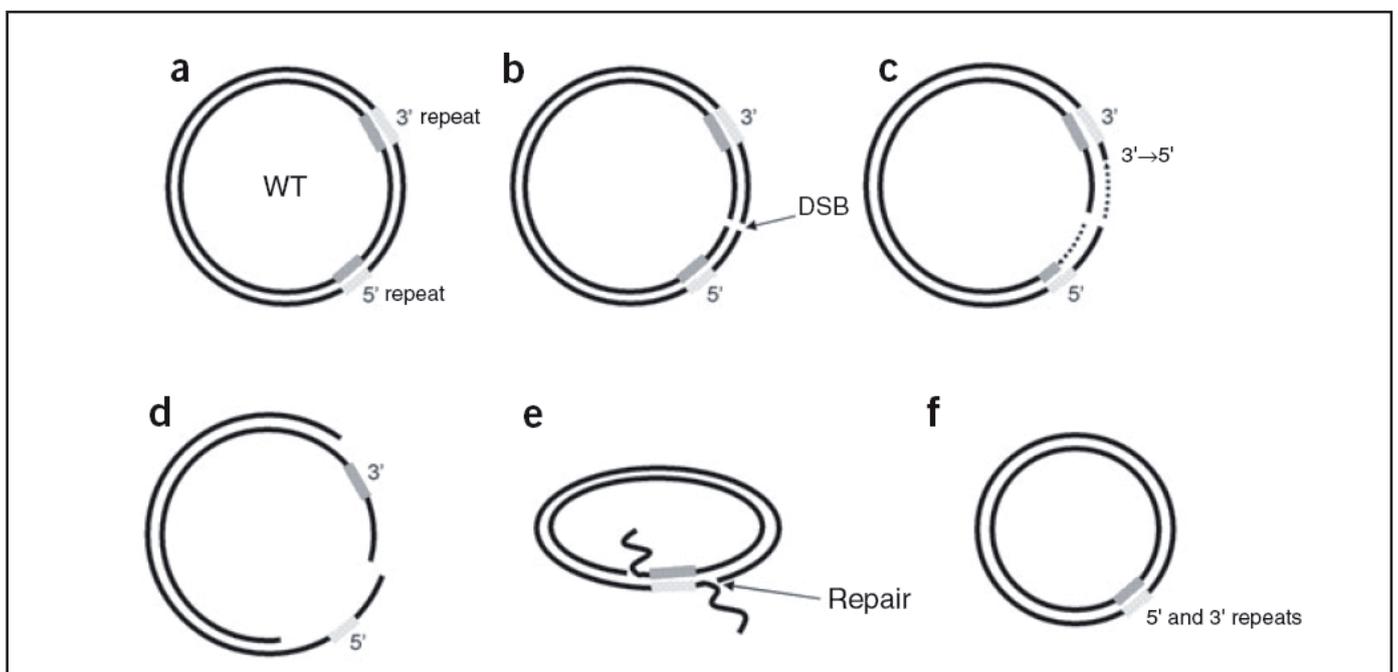
### **2.2.1 Réarrangements de l'ADNmt**

Les réarrangements de l'ADNmt se présentent sous la forme de duplications, mais également de délétions de 1,3 à 8 kb provoquant la perte d'un certain nombre de gènes. Ce type de mutation est toujours hétéroplasmique. Les délétions que l'on retrouve au sein des cellules d'un même patient peuvent être soit identiques soit différentes reflétant le mode d'occurrence de la mutation. Les délétions de l'ADNmt de tailles différentes sont la conséquence de mutations de l'ADN nucléaire (discuté dans le paragraphe de l'introduction II.3.2.2) ou de dommages engendrés par les ROS dans les tissus post-mitotiques âgés. Par contre, la présence d'une délétion identique au sein de toutes les molécules d'ADNmt mutées d'un même individu indique quant à elle qu'elle se serait produite tôt lors de l'embryogenèse ce qui permettrait ensuite à la molécule mutée d'être amplifiée par expansion clonale et



**Figure 9: Schéma représentant le mécanisme de formation d'une délétion par un glissement de brin lors de la réplication. Adapté de (Krishnan et al, 2008).**

- A) ADNmt sauvage indiquant la présence de deux séquences répétées.
- B) Réplication de l'ADNmt selon le modèle non synchronisé
- C) La séquence 3' répétée du brin H déplacé s'hybride à la séquence 5' du brin L en cours de réplication, formant une boucle simple brin susceptible de subir une cassure.
- D) La boucle est dégradée et les extrémités libres du brin H sont liguées.
- E et F) La réplication reprend aboutissant à la formation d'une molécule d'ADNmt sauvage et délété.



**Figure 10: Schéma représentant la formation de la délétion durant la réparation d'une cassure double brin. Adapté de (Krishnan, K 2008)**

- A) ADNmt sauvage avec deux séquences répétées directes.
- B) Production d'une cassure double brin.
- C et D) Deux extrémités simple brin sont générées par une activité exonucléase 3'-5'.
- D) Les séquences répétées s'hybrident, les extrémités simples brins sont dégradées et les régions double brin liguées.
- F) L'erreur de répartition aboutit à une molécule délétée.

d'envahir plusieurs tissus. Les cas de transmission de ce type de réarrangement par la mère étant quasiment inexistant, il est possible qu'un mécanisme de sélection encore mal compris existe au cours de la gamétogénèse éliminant les cellules germinales porteuses de ces mutations (Fan et al, 2008).

Quelque soit leur type et leur origine, les délétions de l'ADNmt partagent des caractéristiques communes. Ainsi, aucune délétion de la boucle de déplacement D et des origines de réplifications OH et OL n'a jamais été reportée, montrant l'importance de ces régions dans la maintenance de l'ADNmt. De plus, la plupart de ces délétions ont lieu entre les origines OH et OL et se révèlent flanquées de courtes répétitions de séquences (Samuels et al, 2004). Ces observations ont permis de proposer deux types de mécanismes aboutissant à la formation de la délétion. Le premier repose sur une erreur se produisant au cours de la réplication de type non synchronisée avec un glissement de brin (**Figure 9**). Le deuxième mécanisme repose quant à lui sur une erreur se produisant lors de la réparation des cassures doubles brin (**Figure 10**) (Krishnan et al, 2008).

Enfin, il est à noter que la sévérité des symptômes cliniques du patient est due en majorité au pourcentage d'ADNmt délété dans la cellule et à sa distribution tissulaire, plutôt qu'à la taille et la localisation de la délétion dans l'ADNmt (Moraes et al, 1995).

### ***Le syndrome de Kearns-Sayre***

Ce syndrome, causé par une délétion de l'ADNmt, se caractérise par une ophtalmoplégie progressive (PEO) correspondant à une paralysie des muscles externes de l'œil empêchant ses mouvements latéraux et par une dégénérescence de la couche pigmentaire de la rétine. Des symptômes secondaires comme une anomalie de la conduction cardiaque, une ataxie, une surdité, une démence, et un diabète sucré peuvent également exister. Un tiers des délétions observées est une délétion dite « commune » de 4997pb entre le gène ATP8 et ND5 (Maceluch & Niedziela, 2006).

### ***Le syndrome de Pearson***

Ce syndrome se produit quand un réarrangement de l'ADNmt est présent dans les cellules souches du sang. C'est une maladie mortelle à début précoce. Elle est due à une incapacité des cellules du sang à utiliser le fer au cours de la synthèse de l'hémoglobine ce qui est à l'origine d'une anémie sidéroblastique. L'autre principal symptôme est une dysfonction



exocrine du pancréas (Cormier et al, 1990). Les enfants survivant à cette maladie développent par la suite un syndrome de Kearns –Sayre (Simonsz et al, 1992).

### 2.2.2 Mutations ponctuelles

Les mutations ponctuelles ne sont pas forcément pathologiques, et peuvent être source de polymorphisme dans l'ADNmt. Ces mutations neutres se transmettent le long de la lignée maternelle. Un polymorphisme bien défini crée un haplotype et les individus ayant le même haplotype appartiennent à un haplogroupe. Il semblerait que ces polymorphismes aient permis aux populations de s'adapter à leur environnement et semblent jouer un rôle dans le développement ou la prévention de certaines maladies, notamment des maladies mitochondriales (Crimi et al, 2003).

Les mutations ponctuelles pathologiques sont susceptibles d'affecter tous les gènes de l'ADNmt, à savoir les protéines, les ARNr et les ARNt. Elles sont en général transmises par la mère et hétéroplasmiques, mais des cas d'homoplasmie ont également été reportés, affectant généralement un tissu unique. Les mutations dans les gènes codant pour les protéines sont susceptibles d'engendrer un dysfonctionnement du complexe protéique auquel il est associé, et donc de la chaîne respiratoire. Les mutations présentes dans les ARNt représentent à elles seules plus de la moitié des mutations ponctuelles alors qu'ils ne représentent que 10% du génome mitochondrial. Trente mutations pathologiques ont été décrites dans le seul gène de l'ARNt<sup>Leu</sup> UUR (**Figure 11**). Ces mutations peuvent affecter l'ARNt de différentes manières : elles peuvent induire un défaut d'aminacylation ou de stabilité, un changement de structure de l'ARNt, affecter la capacité de liaison de l'ARNt à différents facteurs protéiques, ou encore empêcher leur clivage permettant la production des transcrits matures par la RNase P (Wittenhagen & Kelley, 2003). Ces mutations ont toutefois la même conséquence, engendrant une baisse générale de la synthèse protéique. Il n'est donc pas étonnant que des mutations dans des ARNt différents ou des mutations différentes dans un même ARNt aboutissent au même phénotype. Il est a contrario plus surprenant qu'une même mutation puisse engendrer des symptômes différents. Cela peut s'expliquer par la distribution tissulaire de la mutation, son taux d'hétéroplasmie, ainsi que par le contexte mitochondrial (haplotype) et nucléaire du patient (mutation nucléaire tissu spécifique amplifiant la mutation mitochondriale).

Les mutations ponctuelles sont définies de la façon suivante : on parle de transition lorsqu'une purine est remplacée par une autre purine et une pyrimidine par une autre pyrimidine, et de transversion dans le cas inverse. Pour ce qui est de la nomenclature, la base convertie est écrite en premier suivie de la position du nucléotide et de la nouvelle base.

### ***Le syndrome MELAS***

La maladie MELAS (Mitochondrial Encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like episodes) est une encéphalopathie avec acidose lactique et accidents vasculaires cérébraux. C'est la pathologie mitochondriale à transmission maternelle la plus fréquente. Une acidose lactique est due au fait que les mitochondries ne métabolisent plus le pyruvate qui est alors réduit en acide lactique qui s'accumule dans le sang et en diminue le pH. Le tableau clinique inclut 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. Le syndrome est principalement dû à la mutation A3243G de l'ARNt Leucine (Goto et al, 1990) mais des mutations dans les ARNt Gln, His, Lys et Ser ainsi que dans les protéines ND1, ND5 et ND6 du complexe I ont également été reportés.

### ***Le syndrome MERFF***

L'épilepsie myoclonique associée aux fibres rouges déchiquetées est une pathologie multisystémique. Tout comme le syndrome MELAS, elle fait partie de l'ensemble des pathologies nommées encéphalopathies mitochondriales. Elle se caractérise par des crises transitoires (épilepsie myoclonique), l'absence de mouvements coordonnés (ataxie) et la perte de cellules musculaires (myopathie) et à un degré moindre la surdité, la démence et la dégénérescence des nerfs spinaux.

L'expression « fibres rouges déchiquetées » fait référence à des agrégats de mitochondries dans les cellules musculaires qui s'accumulent pour tenter de pallier aux déficits de la chaîne respiratoire. Leur coloration en rouge par un réactif spécifique du complexe II de la chaîne respiratoire, le réactif de Gomori, est un des principaux tests réalisés pour diagnostiquer une maladie mitochondriale.

Cette maladie, qui se manifeste généralement dès l'enfance, est la conséquence d'une mutation ponctuelle dans l'ARNt mitochondrial lysine (A8344G, T8356C ou G8363A)

(Shoffner et al, 1990). D'autres mutations moins courantes dans les ARNt Phe, His, Ser et dans la protéine ND5 du complexe I ont également été reportées.

### ***Le syndrome NARP : Retinite pigmentaire avec neuropathie et Ataxie***

Ce syndrome se caractérise par un retard du développement, une faiblesse musculaire, une démence, des convulsions, une rétinite pigmentaire et des fonctions sensorielles amoindries. Il est causé par la mutation T8993G du gène de l'ATPase 6 du complexe V. Les syndromes apparaissent lorsque le taux d'hétéroplasmie atteint 70%.

### ***Le syndrome Leigh***

Le syndrome de Leigh est un parfait exemple de la notion de l'effet de seuil: il est dû à la même mutation que le syndrome Narp mais se déclenche lorsque l'hétéroplasmie dépasse les 90% (Tatuch et al, 1992). La maladie devient alors une maladie infantile mortelle caractérisée par une dégénérescence des neurones des noyaux cérébraux et du bulbe rachidien (Finsterer, 2008) .

Si ce syndrome peut également être causé par des mutations dans des ARNt (Leu, Val, Trp et Lys) et dans des protéines du complexe I, IV et V il est intéressant de noter que de multiples mutations dans le génome nucléaire ont aussi été reportées et seront décrites plus loin.

### ***Le syndrome LHON : neuropathie optique héréditaire de Leber***

Ce syndrome se caractérise par une perte de la vision due à une atrophie optique bilatérale chez le jeune adulte le plus souvent de sexe masculin. Trois mutations dans les gènes codant pour les sous unités du complexes I sont mises en cause : G11778A dans ND4, G3460A dans ND1 et T14484C dans ND6 (Man et al, 2002). Il est à noter que ces mutations sont parmi les rares à être homoplasmiques. On ne sait à ce jour pas pourquoi la maladie touche préférentiellement les hommes.

Catégorie	Nombre
Apoptose	50
Chaperones	20
Cytochromes	15
Cytosquelette	10
Réparation de l'ADN	12
Cluster Fe-S	3
Système immunitaire	2
Métabolisme	350
Dynamique	10
Réplication	10
Transcription	30
Régulation	5
Porines	4
ROS	15
Protéases	25
Nucléases	5
Modification ARN	5
Traduction	15
Protéines ribosomales	91
ARNt synthétases	22
Transporteurs	75
Repliement des protéines	12
Import des protéines	30
Complexes chaîne respiratoire et assemblage	150
Autres	175
Fonction Inconnue	150

**Tableau 3: Liste des protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire. Adapté de (Wong , 2010)**

### 3 Les mutations du génome nucléaire

Environ 150 mutations du génome nucléaire associées à des maladies mitochondriales ont aujourd'hui été identifiées, mais leur nombre est potentiellement beaucoup plus élevé (Calvo et al, 2006). En effet, si l'ADNmt code pour 13 protéines de la chaîne respiratoire, toutes les autres sont codées par le génome nucléaire. A ces 72 protéines dévolues au processus de la phosphorylation oxydative s'ajoutent de plus toutes celles impliquées indirectement dans le fonctionnement de la mitochondrie: celles impliquées dans l'importation des protéines mitochondriales, dans l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire, celles participant à la traduction des transcrits mitochondriaux, gouvernant la maintenance de l'ADNmt, ou encore les mécanismes de fusion et de fission (**Tableau 3**). Il est donc plus que probable qu'au cours des prochaines années de nombreuses nouvelles mutations s'ajoutent à celles répertoriées ci-dessous.

#### 3.1 Mutations nucléaires des gènes de structure et d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire.

La première catégorie de mutations nucléaires regroupe les mutations dans des gènes codant directement pour des protéines de la chaîne respiratoire et pour celles permettant leur assemblage en complexes. Parmi ceux-ci, les gènes *NDUFS* et *NDUFV* codant pour des protéines du complexe I sont mis en cause dans le syndrome de Leigh décrit plus haut (II.2.2.2) (Triepels et al, 2001). Les mutations dans des gènes *SDH* codant pour des sous unités du complexe II ont également été associées à ce syndrome ainsi que dans des tumeurs bénignes ectodermiques appelées paragangliomes (Bourgeron et al, 1995). A ces anomalies des protéines de structure peuvent s'ajouter les déficits touchant le co-enzyme Q10 dont le phénotype associe de façon variable myoglobinurie (présence de myoglobine dans les urines), retard mental et ataxie (Lamperti et al, 2003). Concernant les mutations affectant des gènes qui contrôlent des protéines d'assemblage de la chaîne respiratoire, il s'agit essentiellement de l'assemblage des complexes III, IV et V. Le déficit là encore s'exprime chez l'enfant par un syndrome de Leigh. Concernant l'assemblage du complexe IV les gènes identifiés sont *SURF-1*, *COX10* et *COX15* (Sacconi et al, 2003; Tiranti et al, 1998). Des mutations dans les gènes *SCO1* et *SCO2* dont les protéines sont impliquées dans l'incorporation de l'atome de cuivre

dans le site catalytique du complexe IV sont reconnus comme étant à l'origine de cardioencéphalopathie ou de coma acido-cétosique infantile. Pour le complexe III, une mutation dans le gène *BCS1L* a été mise en évidence (de Lonlay et al, 2001) et pour le complexe V le gène *ATP12* (De Meirleir et al, 2004). A côté de ces gènes codant pour des protéines d'assemblage on peut enfin rajouter ceux impliqués dans la synthèse des lipides aidant à la structuration et la modulation de l'activité des complexes dans la membrane interne de la mitochondrie. Ainsi, une anomalie dans le métabolisme des cardiolipines, causée par une mutation dans le gène d'une phospholipide acetyltransferase *TAZ* conduit à un syndrome de Barth, une myopathie liée au chromosome X (Bione et al, 1996).

### **3.2 Mutations nucléaires associées à une atteinte qualitative et quantitative de l'ADNmt.**

#### **3.2.1 Mutations provoquant des délétions de l'ADNmt**

Le syndrome le plus répandu est celui de l'ophtalmoplégie externe progressive à transmission autosomique dominante AD-PEO. Cette maladie se caractérise par un ptosis et une faiblesse des muscles squelettiques. A ces symptômes peuvent s'ajouter une ataxie, une surdité et une dépression. On observe chez un même patient des délétions de tailles variables contrairement à celles du syndrome de Kearns-Sayre. Ceci indique qu'elles ne sont pas dues à une mutation sporadique ayant subi une amplification clonale au cours de l'embryogenèse mais à une mutation dans un gène nucléaire qui contrôlerait la maintenance et l'intégrité de l'ADNmt. Ainsi certains gènes causant ce type de syndrome ont été identifiés comme étant celui de l'adénine nucléotide translocase de type 1 (*ANT1*), le gène de l'hélicase Twinkle et de la polymérase POLG (Hirano & DiMauro, 2001). Un autre syndrome se caractérisant par des délétions multiples, le syndrome MNGIE (encephalomyopathie neurogastrointestinale) est quant à lui causé par une mutation dans le gène de la thymidine phosphorylase causant un excès de dTTP, déséquilibrant ainsi le pool de dNTP et réduisant la fidélité de la POLG (Nishino et al, 1999).

### 3.2.2 Mutations provoquant des déplétions de l'ADNmt

A ces mutations touchant à l'intégrité de l'ADNmt s'ajoutent les mutations causant une diminution de son nombre de molécules. Ce phénomène de déplétion engendre des syndromes dénommés MDS (Mitochondrial Depletion Syndrome) souvent associés à des myopathies et des hepatoencephalopathies infantiles. Les mutations identifiées sont celles du gène de la thymidine kinase TK2 et celui de la deoxy-guanosine kinase, tous deux impliqués dans le métabolisme des dNTP. Une mutation dans l'hélicase Twinkle a également été reportée (Rotig & Poulton, 2009).

### 3.3 Mutations nucléaires affectant le fonctionnement de la chaîne respiratoire de façon indirecte

Ce groupe rassemble les gènes codant pour des facteurs mitochondriaux indirectement impliqués dans la phosphorylation oxydative qui s'expriment par des maladies non véritablement considérées comme des maladies de la chaîne respiratoire mais physiopathologiquement liées à des modifications de la production énergétique. Il s'agit du gène codant pour la protéine d'importation mitochondriale *DDPI* impliquée dans le syndrome Mohr-Tranebjaerg (Roesch et al, 2002), du gène *ABC7* codant pour un transporteur du fer impliqué dans une anémie sidéroblastique (Allikmets et al, 1999), du gène de la frataxine assurant le stockage du fer mitochondrial, mis en cause dans l'ataxie de Friedreich (Campuzano et al, 1996) et du gène *ATP7B* lui aussi impliqué dans la régulation du métabolisme du fer responsable de la maladie de Wilson (Bingham et al, 1998). Enfin une mutation dans le gène *OPA1* codant pour une dynamine de la membrane interne a été associée à une neuropathie optique (Alexander et al, 2000) et une mutation dans le gène de la mitofusine 2 régulant les mécanismes de fusion et de fission a été associée à la maladie de Charcot Marie Tooth, une neuropathie (Zuchner et al, 2004).

## 4 Modèles d'études

La compréhension de l'ensemble des maladies décrites ci-dessus doit beaucoup à l'étude des conséquences moléculaires des mutations dans des modèles d'études. Les cellules cybrides représentent le modèle le plus utilisé pour étudier les mutations de l'ADNmt conduisant à des maladies mitochondriales. Elles sont le résultat de la fusion de cellules énucléées porteuses d'une mutation dans l'ADNmt avec des cellules immortalisées déplétées en ADNmt (cellules  $\rho^0$ ). Elles permettent de vérifier l'origine génétique d'une mutation, d'étudier l'impact de mutations différentes dans un contexte nucléaire identique et *vice versa* une mutation identique dans des contextes nucléaires différents. Elles permettent également d'étudier les conséquences du taux d'hétéroplasmie d'une mutation ainsi que le mécanisme moléculaire par lequel la mutation affecte les fonctions cellulaires (Swerdlow, 2007).

Outre les cellules cybrides, la levure s'est également révélée être un modèle intéressant. En effet, il est possible de transformer les mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae* par de l'ADN et d'introduire des mutations dans l'ADNmt de la levure à l'endroit voulu. Cela a récemment permis d'étudier les conséquences biochimiques d'une mutation dans le gène de l'ATPase 6 causant le syndrome de Leigh, montrant que la sous unité était mal incorporée dans l'ATP synthase et induisait un changement de morphologie de la mitochondrie (Kucharczyk et al, 2009). A ce jour, la levure a surtout été utilisée pour étudier les mutations dans les ARNt. En effet, quelques ARNt de levure partagent une homologie de séquence et de structure avec les ARNt humains. De plus, la levure étant capable de survivre à l'absence d'ADNmt fonctionnel grâce à la fermentation, l'étude de mutations conduisant à un dysfonctionnement sévère des mitochondries est possible (Montanari et al, 2008). La levure a ainsi permis d'identifier des suppresseurs de mutations dans les ARNt. La surexpression du facteur d'élongation EFTu (Feuermann et al, 2003) et de la leucyl-tRNA synthetase mitochondriale (De Luca et al, 2006) conduisent à la restauration des dysfonctionnements causés par les mutations de l'ARNt<sup>Leu</sup> causant le syndrome MELAS. Ces résultats ont par la suite été confirmés dans des cellules cybrides (Park et al, 2008; Sasarman et al, 2008).

Concernant les modèles animaux, plusieurs souris transgéniques ont pu être construites avec des mutations du gène du transporteur ADP/ATP, du gène NDUFS4 correspondant à une sous unité du complexe I, des gènes d'assemblage du complexe IV SURF1 et COX10, des gènes de la fusion mitochondriale MFN1, MFN2 et OPA1 ou encore de la réplication mitochondriale POLG, Twinkle et TFAM (Tyynismaa & Suomalainen, 2009). Alors que le développement de souris mimant des maladies mitochondriales liées à des mutations nucléaire progresse rapidement, le développement de souris porteuses de mutations dans le génome mitochondrial se heurte depuis longtemps à la difficulté de modifier l'ADNmt. Quelques modèles de souris ont toutefois vu le jour ces dernières années.

La première souris hétéroplasmique a été générée par la fusion cytoplasmique de l'ADMnt de deux souris aux haplotypes différents. Ces souris ont permis de montrer la présence préférentielle des deux types d'ADNmt dans des tissus différents, et pourraient donc permettre de mieux comprendre les mécanismes qui président à la spécificité tissulaire de certaines mutations et à leur mode de ségrégation (Jenuth et al, 1997). D'autres souris montrant un dysfonctionnement mitochondrial et capables de transmettre la mutation aux générations suivantes ont également été créées. Le premier modèle de souris a été appelé « Mito-mice » et porte une délétion de l'ADNmt hétéroplasmique. Les symptômes développés se sont révélés proches de ceux du syndrome de Pearson (Inoue et al, 2000; Nakada et al, 2004). Des souris porteuses de mutations ponctuelles hétéroplasmiques dans les gènes ND6 et CO1 ont également été créées, conduisant à une myopathie et une cardiomyopathie (Fan et al, 2008). Enfin, il est à noter qu'un modèle canin porteur d'une mutation dans le gène de l'ARNt<sup>Tyr</sup> mitochondrial corrélé à des symptômes neurologiques a récemment été décrit (Baranowska et al, 2009).

### **III Stratégies thérapeutiques**

Au cours des deux dernières décennies une avancée considérable dans la compréhension des mécanismes qui sous-tendent à l'apparition des maladies mitochondriales a été réalisée. Toutefois, et ce malgré de nombreux efforts, aucun traitement efficace à proposer aux patients n'a encore pu voir le jour. Ce constat d'échec apparent trouve son explication en de multiples facteurs : la complexité des maladies mitochondriales, le manque de modèles animaux, l'impossibilité de transformer les mitochondries avec du matériel génétique.

Si on ne dispose que d'un arsenal thérapeutique limité à proposer aux patients, les recherches réalisées dans de multiples laboratoires de par le monde ont toutefois permis de trouver des solutions palliatives permettant d'améliorer la qualité de vie, d'amoinrir la gravité de certains symptômes et d'en prévenir les complications.

#### **1 Solutions palliatives**

##### **1.1 Procédures chirurgicales**

Pour les affections touchant le système sensoriel comme l'audition et la vue des solutions chirurgicales peuvent être envisagées : implants cochléaires (Karkos et al, 2005), traitement du ptosis, excision de la cataracte. Pour les patients chez qui un phénotype prédomine dans un organe très ciblé, il est possible de proposer une transplantation, majoritairement du cœur (Bhati et al, 2005) ou du foie.

##### **1.2 Traitements pharmacologiques**

Les traitements pharmacologiques sont quasi inexistant. De multiples solutions pour diminuer le taux de métabolites toxiques et de radicaux libres ont été expérimentés mais seules deux stratégies ont donné des résultats positifs réellement prometteurs chez le patient: l'administration de Coenzyme Q10 et la réduction du taux de lactate.

Le coenzyme Q10 permet le transfert des électrons du complexe I et II au complexe III de la chaîne respiratoire et joue un rôle protecteur contre les radicaux libres . Il a l'avantage de pouvoir être administré sans conséquences néfastes apparentes à des doses élevées (jusqu'à

2g par jour). Des résultats positifs ont été obtenus pour des maladies neurodégénératives comme par exemple l'ataxie de Friedreich *via* l'administration d'une forme synthétique du coenzyme Q10 capable de traverser la barrière hémato encéphalique, l'Idebenone (Schulz et al, 2009).

Concernant la réduction du taux de lactate dans le sang elle a été observée chez plusieurs patients chez qui on avait administré du DCA (Dichloroacetate), un analogue du pyruvate qui inhibe la pyruvate deshydrogénase kinase la laissant ainsi sous une forme dephosphorylée et active pour métaboliser le pyruvate engendrant par conséquent une réduction de lactate dans le sang et le liquide cerebrospinal (Berendzen et al, 2006).

Quoique positifs et amenant parfois une véritable amélioration de qualité de vie pour le patient, ce type de traitements peuvent avoir des résultats différents d'un individu à l'autre. Des essais cliniques réalisés en double aveugle en présence de placebo seront donc à mettre en place dans le futur.

## **2 Transfert cytosolique**

Concernant les maladies liées à des mutations dans l'ADNmt la meilleure des solutions serait de pouvoir éviter que la mutation soit transmise de la mère à l'enfant. Ceci a été réalisé avec succès très récemment en Angleterre en transférant le noyau d'un ovocyte fertilisé appartenant à une femme porteuse du syndrome MELAS dans l'ovocyte énucléé d'une donneuse saine (Craven et al, 2010). Si l'embryon ainsi créé était implanté dans l'utérus de la mère, il pourrait théoriquement donner naissance à un enfant sain portant le génome nucléaire de ses parents et l'ADNmt d'une autre femme. Une variante de cette approche a ainsi permis de donner naissance à des singes rhésus sans problèmes apparents, mais les conséquences sur le long terme de la coexistence d'un ADN mitochondrial avec un ADN nucléaire issu d'une autre personne restent à surveiller (Tachibana et al, 2009). Ainsi, outre les problèmes éthiques qu'elle soulève (création d'embryons pour la recherche, procurement des ovocytes...), cette méthode prometteuse devra prouver son innocuité avant de pouvoir être réellement envisagée.

### **3 Stimulation de la biogenèse mitochondriale**

Ces dernières années, une voie de signalisation contrôlant l'expression des composants nucléaires de la chaîne respiratoire ainsi que le facteur de transcription TFAM a été caractérisée (Scarpulla, 2008). Cette voie est régulée par les coactivateurs de la transcription PGC1a, 1b (peroxysome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activator) et PRC (PCG-related coactivator). En réalisant un knockout du facteur d'assemblage COX10 de la chaîne respiratoire chez des souris, il a été montré que la surexpression de PGC1a permettait de restaurer leurs fonctions musculaires en augmentant la biogenèse mitochondriale (Wenz et al, 2008). Le développement d'agonistes de PGC1a comme le bezafibrate pourrait donc se révéler être un puissant outil thérapeutique pour les maladies causées par des mutations des composants de la chaîne respiratoire.

### **4 Thérapie génique**

En l'absence de traitements pharmacologiques classiques efficaces pour traiter les conséquences des maladies mitochondriales, il est important que toutes les pistes de thérapies soient considérées et explorées. Ces dernières années, les résultats les plus prometteurs ont été obtenus sur des cellules et des modèles animaux dans lesquels des essais de thérapie génique ont été modélisés.

La thérapie génique des maladies mitochondriales liées à des mutations dans l'ADN nucléaire est confrontée aux problèmes rencontrés par n'importe quelle autre maladie d'origine génétique : choix des vecteurs, mode de ciblage des tissus affectés, potentielles réactions immunologiques. La découverte des gènes nucléaires causant des maladies mitochondriales étant de plus relativement récente, aucun essai de thérapie génique pour ce type de pathologies n'a encore été reporté dans la littérature.

Paradoxalement, les efforts se sont plutôt portés lors de la dernière décennie sur les maladies liées à des mutations de l'ADNmt alors que les obstacles à affronter sont encore plus nombreux de par l'impossibilité de transformer les mitochondries avec de l'ADN pour manipuler leur génome, du fait que l'ADNmt soit polyploïde et que les mutations soient la plupart du temps hétéroplasmiques. Pour contourner ces problèmes, deux principales solutions ont été explorées : adresser dans la mitochondrie non pas le gène sain mais son produit et diminuer le taux d'ADNmt muté dans la cellule.

## 4.1 La stratégie allotopique

La stratégie allotopique consiste à insérer dans le génome nucléaire un gène sain et recodé correspondant à un gène défectueux dans la mitochondrie. Cette stratégie a pour la première fois été testée en 1988 chez une levure portant une mutation dans le gène MTATP8 de l'ADNmt. Les auteurs avaient alors montré qu'il était possible de restaurer les fonctions de l'ATP synthase en exprimant dans le noyau le gène codant pour l'ATPase 8 couplé à une séquence d'import mitochondriale (Nagley et al, 1988). Il faudra ensuite attendre plusieurs années pour que la stratégie soit testée avec succès dans des cellules humaines en culture, cette fois ci avec le gène MTATP6 codant pour l'ATPase 6 (Guy et al, 2002). Ces résultats porteurs d'optimisme pour traiter les patients atteints d'une telle mutation (syndrome NARP) ont été plus tard contestés par une étude montrant que la protéine n'était pas intégrée dans le complexe V (Bokori-Brown & Holt, 2006). La difficulté de la méthode étant d'importer dans la mitochondrie des protéines extrêmement hydrophobes, il a ensuite été tenté de favoriser l'adressage des transcrits directement vers la membrane externe de l'organite pour permettre aux protéines d'y être transloquées de façon co-translationnelle empêchant ainsi la formation d'agrégats cytosoliques. Cet adressage, obtenu grâce à la séquence d'import mitochondriale MTS et la séquence 3'UTR non traduite de l'ARNm, a permis de restaurer les fonctions de la chaîne respiratoire dans des fibroblastes de patients portant des mutations dans les gènes mitochondriaux ND1, ND4 et ATP6 (Bonnet et al, 2008).

Ainsi, l'optimisation de la méthode allotopique a permis de mettre en place une stratégie thérapeutique prometteuse mais qui reste à tester sur des modèles animaux.

La méthode xénotopique est une variante de la stratégie allotopique. Elle consiste à exprimer dans des cellules humaines ayant des sous-unités de la chaîne respiratoire défectueuses des protéines homologues d'espèces différentes. Deux exemples ont été reportés dans la littérature récemment.

Le premier repose sur l'utilisation de l'enzyme AOX, une oxydase alternative présente chez de nombreuses espèces. En exprimant l'AOX de l'ascidien *Ciona intestinalis* dans des fibroblastes humains ayant un déficit de la cytochrome c oxydase (complexe IV), la protéine a pu être synthétisée dans le cytosol et être adressée à la membrane interne de la mitochondrie, compensant les défauts de croissance des cellules, leur conférant une résistance au cyanure et jouant de plus un rôle important d'antioxydant (Dassa et al, 2009).

Le deuxième exemple de stratégie xénotopique repose quant à lui sur l'utilisation de la NADH oxydase de *Saccharomyces cerevisiae* nommée Ndi1. L'expression de cette protéine dans des cellules humaines ayant des sous unités de la NADH :ubiquinone oxidoreductase défectueuses a également permis de corriger le défaut (Bai et al, 2001) ((Park et al, 2007). Outre les maladies liées à un dysfonctionnement du complexe I, la protéine Ndi1 s'est également révélée utile dans la maladie de Parkinson provoquée par la prise d'un hallucinogène, le MPTP. Cette drogue qui inhibe le complexe I de la chaîne respiratoire chez l'homme n'a pas d'effet sur Ndi1. L'expression de la protéine chez des rats exposés au MPTP a ainsi permis de les protéger de toute neurodégénération (Barber-Singh et al, 2009).

Si ces résultats obtenus à la fois sur des cellules et des modèles animaux sont très impressionnants et prometteurs, il sera toutefois important de montrer l'innocuité de l'expression de gènes d'organismes très éloignés de l'homme. Cette considération pourrait se révéler un obstacle de taille pour acquérir l'autorisation de démarrer de potentiels essais cliniques chez l'homme.

## 4.2 Modulation du taux d'hétéroplasmie

Le deuxième grand type de thérapie génique imaginé pour traiter les maladies liées à des mutations dans l'ADNmt consiste à jouer sur le niveau d'hétéroplasmie. En effet, les symptômes n'étant observés qu'à partir d'un fort taux d'ADNmt muté, généralement supérieur à 60%, on peut imaginer qu'une baisse de ce taux, même petite, pourrait suffire à restaurer les fonctions de la chaîne respiratoire.

Un shift d'hétéroplasmie a pour la première fois été observée en 1988. Une hétéroplasmie artificielle avait été créée en injectant des mitochondries isolées contenant un gène de résistance au chloramphénicol dans des cellules. La culture des cellules en présence de l'antibiotique induisit une rapide repopulation des cellules avec l'ADNmt exogène (King & Attardi, 1988).

Un changement d'hétéroplasmie a également pu être obtenu dans une étude en cultivant des cellules porteuses d'une mutation ponctuelle hétéroplasmique de l'ADNmt en présence d'oligomycine, un inhibiteur de l'ATP synthase, et de galactose à la place de glucose comme source de carbone (obligeant ainsi les cellules à utiliser la respiration oxydative pour seule source d'ATP). Cette stratégie a permis d'augmenter le taux d'ADNmt sauvage non seulement de façon intercellulaire mais également de façon intracellulaire (Manfredi et al,

1999). Des résultats similaires furent obtenus en substituant le glucose du milieu par des corps cétoniques (Santra et al, 2004). Bien qu'il soit difficile d'envisager l'application de tels traitements à un organisme entier, ces études auront eu le bénéfice de montrer qu'un shift d'hétéroplasmie était possible, permettant de restaurer les fonctions de la mitochondrie.

#### 4.2.1 Expression allotopique d'enzymes de restriction

Cette méthode repose sur la dégradation spécifique de l'ADNmt muté. En effet, il arrive que certaines mutations du génome mitochondrial créent des sites de restriction qui ne sont pas présents dans l'ADNmt sauvage. En tirant parti de ce phénomène, l'expression allotopique d'enzymes de restriction s'est révélée à ce jour être la stratégie la plus probante pour induire un shift d'hétéroplasmie. Elle repose sur l'expression dans le cytoplasme d'enzymes de restriction fusionnées à une séquence d'import mitochondriale leur permettant d'être importées dans l'organite pour y engendrer une cassure double brin spécifique de l'ADNmt muté.

Le premier shift d'hétéroplasmie obtenu par cette méthode le fut en 2001 dans une lignée de cellules hybrides contenant des molécules d'ADNmt de rat et de souris différant par la présence d'un site de restriction PstI (Srivastava & Moraes, 2001). La même stratégie fut ensuite utilisée dans des cellules portant une mutation dans le gène de l'ATPase 6 créant un site SmaI associé au syndrome de Leigh. Une déplétion du taux d'ADNmt muté suivie d'une repopulation par l'ADNmt sauvage fut observé ainsi qu'une restauration de la production d'ATP (Tanaka et al, 2002). Forte de ce succès, la stratégie fut alors testée chez un modèle de souris asymptomatiques NZB/BALB contenant deux populations d'ADNmt aux polymorphismes différents. Une enzyme de restriction ApaI fut exprimée dans le cerveau et les muscles squelettiques *via* une transfection adenovirale conduisant à la baisse spécifique de l'ADNmt NZB seul porteur du site ApaI (Bayona-Bafaluy et al, 2005). Ce système étant *a priori* limité aux mutations créant des sites de restriction uniques dans l'ADNmt, fait d'une occurrence relativement rare, de nouvelles approches furent réalisées pour tenter de contrecarrer ce problème. Cette fois ci les souris NZB/BALB furent transfectées avec des enzymes des restriction ScaI, site présent 5 fois dans l'haplotype NZB et 3 fois dans l'haplotype BALB. Bien qu'une déplétion générale de l'ADNmt ait été observée à un fort niveau d'expression de l'enzyme, une diminution spécifique de l'ADNmt NZB fut obtenue dans le foie et les muscles squelettiques des souris, prouvant la validité de l'approche (Bacman et al, 2007)

Une autre méthode permettant de dégrader spécifiquement l'ADNmt muté repose sur l'utilisation de peptides à doigt de zinc ZPF importables dans les mitochondries (appelés ainsi car ils contiennent des résidus histidine et cystéine ayant la capacité de lier le zinc). De tels peptides, capables de se lier à une séquence précise de l'ADNmt, furent fusionnés à une méthyltransférase. Une fois intégrés dans des cellules en culture par transfection, ces peptides se révélèrent capables d'être importés dans la mitochondrie, de se lier à la séquence d'ADNmt ciblée et de la méthyle (Minczuk et al, 2006). L'étude a ensuite été poursuivie en fusionnant cette fois-ci une nucléase au peptide ZPF conduisant à une dégradation spécifique de l'ADNmt muté (Minczuk et al, 2008).

#### **4.2.2 Régénération musculaire**

Cette stratégie est basée sur l'observation que les cellules satellites comprises dans les fibres musculaires n'ont souvent qu'un taux extrêmement bas d'ADNmt muté. Il est possible d'activer la prolifération de ces cellules en réponse à un exercice sportif d'endurance ce qui pourrait en théorie aboutir à la formation de nouvelles fibres musculaires au taux d'hétéroplasmie plus bas. Toutefois, bien que des améliorations biochimiques et physiologiques aient été observées au niveau des muscles de certains patients ayant suivi un programme d'exercices sportifs sur plusieurs semaines, aucun changement d'hétéroplasmie n'a jamais pu être observé et les bénéfices obtenus sont généralement perdus après arrêt du traitement (Murphy et al, 2008).

#### **4.2.3 Stratégie antigénomique**

Une autre stratégie prometteuse pour générer un shift d'hétéroplasmie réside dans l'idée d'inhiber sélectivement la réplication de l'ADNmt muté au profit de la réplication de l'ADNmt sauvage. En effet, l'ADNmt est continuellement répliqué dans les cellules même dans les tissus post mitotiques comme les muscles squelettiques. En ajoutant à cela que les cellules tendent à toujours avoir un niveau stable d'ADNmt (King & Attardi, 1988), on peut imaginer que l'adressage dans les mitochondries d'agents capables d'interférer spécifiquement avec la réplication de l'ADNmt muté permettrait aux molécules sauvages de repeupler la cellule avec l'ADNmt sauvage pour atteindre le niveau d'ADNmt initial. De tels agents antigénomiques ont été construits sous la forme de PNA ou peptide nucleic acid consistant en un oligonucléotide capable de reconnaître une séquence d'ADN avec une grande

spécificité. Cette grande affinité de liaison est conférée par la présence d'un squelette peptidique non chargé à la place d'un squelette sucre phosphate chargé négativement. Les PNA se sont tout d'abord révélés très prometteurs en étant capables d'inhiber spécifiquement la réplication de l'ADNmt muté dans un système de réplication *in vitro*. Pour permettre leur import dans les mitochondries *in vivo* les PNA ont ensuite été fusionnés soit à un peptide d'adressage mitochondrial (Chinnery et al, 1999) soit à des cations lipophiliques (Muratovska et al, 2001). Malgré une apparente colocalisation avec les mitochondries, aucune modulation du taux d'hétéroplasmie ne put cependant être observée dans des cellules en culture et il fut émis l'hypothèse que ces agents devaient être déplacés par la machinerie répliquative. Des PNA capables d'interagir cette fois-ci de façon covalente avec l'ADN furent alors construits mais sans plus de résultats (Ross et al, 2003). Après un étude approfondie, il se révéla que le problème résidait dans le fait que de tels oligonucléotides artificiels n'étaient malheureusement pas capables de franchir la membrane interne de la mitochondrie (Smith et al, 2004).

Séduisante sur le papier, la stratégie antigénomique s'est donc révélée source de frustration dans la pratique en se confrontant à un obstacle de taille : l'adressage dans la mitochondrie des agents anti-répliquatifs. En effet, les mécanismes qui gouvernent les processus d'import/export de l'organite sont extrêmement régulés et sélectifs. Si la compréhension du mécanisme d'import des protéines mitochondriales a permis d'importer efficacement des protéines pour compléter certaines mutations, une autre voie d'import a été utilisée avec succès dans le même but et pourrait s'avérer utile pour la stratégie antigénomique : la voie d'import des ARN.

Organisme	Nombre d'ARNt importés	Preuves de l'importation	Source
<b>Protistes</b>			
<b>Euglénozoaires</b>			
<i>Leishmania tarentolae</i>	tous	(1), (2), (3) et (4)	(Lye et al., 1993)
<i>Leishmania donovani</i>	tous	(1), (2), (3) et (4)	(Chen et al., 1993)
<i>Trypanosoma brucei</i>	tous	(1), (2), (3) et (4)	(Hancock et al., 1990; Schneider et al., 1994)
<b>Histionidés :</b>			
<i>Jacoba libera</i>	1	(1)	OGMP, OGD
<b>Rhizopodes :</b>			
<i>Acanthamoeba castellanii</i>	7	(1)	OGMP, OGD
<b>Dictyostéliidés :</b>			
<i>Dictyostelium discoideum</i>	4	(1)	OGMP, OGD
<b>Ciliés :</b>			
<i>Tetrahymena Pyriformis</i>	26	(2) et (3)	(Chiu et al., 1993; Suyama et al., 1967)
<b>Apicomplexes :</b>			
<i>Plasmodium falciparum</i>	tous	(1)	OGMP, OGD
<b>Labyrinthulomycètes :</b>			
<i>Thraustochytrium aureum</i>	2	(1)	OGMP, OGD
<b>Stramenopilés :</b>			
<i>Phytophthora infectans</i>	1	(1)	OGMP, OGD
<b>Chrysophytes :</b>			
<i>Ochromonas danica</i>	2	(1)	OGMP, OGD
<b>Biscosoécidés :</b>			
<i>Cafeteria roenbergensis</i>	2	(1)	OGMP, OGD
<b>Algues</b>			
<b>Rhodophytes :</b>			
<i>Chondrus crispus</i>	2	(1)	OGMP, OGD
<b>Chlorophytes :</b>			
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	tous sauf 3	(1)	OGMP, OGD
<i>Pedinomonas minor</i>	tous sauf 7	(1)	OGMP, OGD
<b>Plantes</b>			
<b>Bryophytes :</b>			
<i>Marchantia polymorpha</i>	3	(1) et (2)	(Akashi et al., 1998)
<b>Gymnospermes :</b>			
<i>Laryx leptoeuropaea</i>	au moins 11	(2)	(Kumar et al., 1996)
<b>Angiospermes :</b>			
<i>Beta vulgaris</i>	tous sauf 6	(1)	OGMP, OGD
<i>Solanum tuberosum</i>	au moins 6	(2) et (3)	(Maréchal-Drouard et al., 1990)
<i>Arabidopsis thaliana</i>	tous sauf 15	(1)	OGMP, OGD
<i>Phaseolus vulgaris</i>	au moins 8	(1) et (2)	(Maréchal-Drouard et al., 1988)
<i>Triticum aestivum</i>	15	(2)	Kumar et al., 1996
<i>Zea mays</i>	au moins 7	(2)	(Glover et al., 2001)
<b>Champignons</b>			
<b>Chytridiomycètes :</b>			
<i>Spizellomyces punctatus</i>	14	(1)	(Laforest et al., 1997)
<b>Ascomycètes :</b>			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	3	(1), (2), (3) et (4)	(Martin et al., 1979; Rinehart et al., 2005)
<b>Animaux</b>			
<b>Mollusques :</b>			
<i>Crassostrea gigas</i>	tous sauf 4	(1)	OGMP, OGD
<b>Cnidaires :</b>			
<i>Metridium senile</i>	tous sauf 2	(1)	OGMP, OGD
<b>Mammifères</b>			
Marsupiaux	1	(1) et (4)	(Döner et al., 2001)
Homme	2	(4)	(Rubio et al, 2008)

**Table 4 : ARNt importés dans les mitochondries de différents organismes , adapté de (Entelis et al.,2001)**

(1): données de séquençage systématique des génomes mitochondriaux (OGMP: «Organelle Genome Megasequencing Program, OGD: «Organelle Genome Database») disponibles sur internet à l'adresse: <http://megasun.bch.umontreal.ca/>.(2): Hybridation en «Northern blot» des ARNt mitochondriaux avec les ADN génomiques ou mitochondriaux .(3): données des expériences de transgénèse (4): système d'importation in vitro des ARNt dans les mitochondries isolées

## IV La voie d'import des ARN dans les mitochondries

### 1 Généralités

Organites semi autonomes, les mitochondries ont besoin pour fonctionner d'importer non seulement presque la totalité de leurs protéines du cytoplasme mais également plusieurs ARN non codants, majoritairement des ARNt. Si pour ce faire elles ont mis en place un système d'import des protéines très bien conservé dans le règne eucaryote et aujourd'hui très bien caractérisé (Chacinska et al, 2009), la situation est totalement différente pour ce qui concerne l'import des ARN. En effet, bien que décrite pour la première fois il y a plus de quarante ans (Suyama, 1967) l'internalisation des ARN au sein des mitochondries n'a commencé à être réellement étudiée qu'au début des années 90. Pris au départ comme un phénomène anecdotique les travaux réalisés depuis ont permis de mettre en évidence sa quasi universalité dans le règne eucaryote. Plantes, protozoaires, champignons ou mammifères, les informations récoltées chez des organismes aussi différents n'ont pourtant pas permis d'aboutir à la description d'un schéma général d'importation. Les divergences portent aussi bien sur le mécanisme même d'importation des ARN que sur leur nombre, leur nature ou encore la cause de leur importation (Entelis et al, 2001; Salinas et al, 2008). Ainsi, il semblerait que la mitochondrie, contrairement au mécanisme d'import des pré-protéines, ait adopté au cours de l'évolution des stratégies d'importation d'ARN différentes selon l'organisme qui l'abritait.

Dans la grande majorité des cas, les mitochondries importent du cytoplasme les ARNt qui ne sont plus codés par leur génome mais qui restent nécessaires à la traduction de leurs transcrits. Par exemple, chez les protistes, un organisme tel que *Trypanosoma brucei* importe tous ses ARNt du cytosol, alors que *Jacoba libera* en importe seulement un (**Tableau 4**). Il est à noter que cette grande variabilité dans le nombre d'ARN importés n'est toutefois pas forcément fonction du nombre d'ARNt codés par l'ADNmt.

Le mécanisme qui sous tend à la sélection de ces ARNt importés reste mal compris. Il semble nécessiter des déterminants détenus dans la structure même des ARNt importés, leur permettant d'être soit reconnus par des récepteurs de la membrane externe de la mitochondrie, soit par des facteurs d'import protéiques pour les dévier du système de traduction cytoplasmique et les adresser vers la mitochondrie. Une fois arrivés à proximité de la membrane externe, leur mode de translocation pose également problème. En effet, d'un

*L. tropica*

*S. tuberosum*

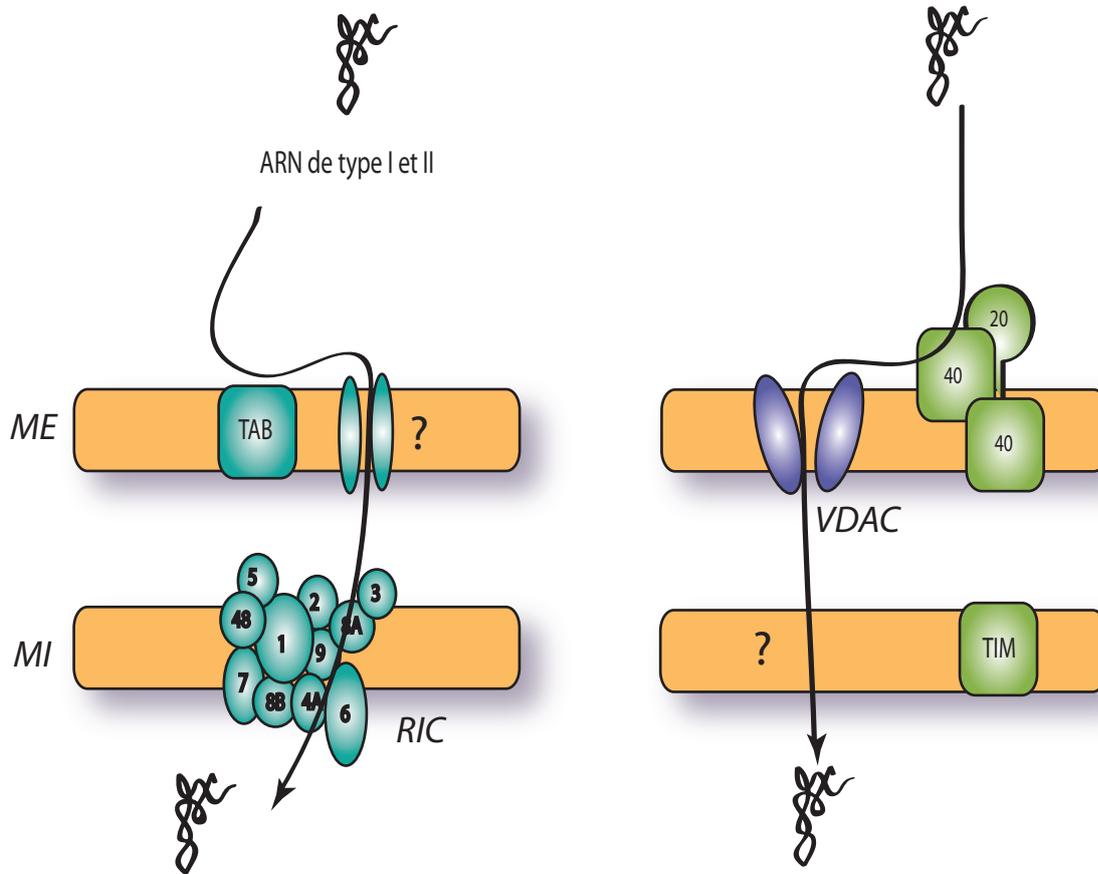


Figure 12: Mécanismes de translocation des ARN importés dans les mitochondries de *L. tropica* et *S. tuberosum*. Adapté de (Salinas et al, 2008)

premier abord, il semble surprenant que des molécules hydrophiles et négatives de près de 25 kDa telles que le sont les ARNt arrivent à traverser la double membrane mitochondriale et ce contre un gradient électrochimique. Là encore, les solutions adoptées par la mitochondrie pour remédier à ce problème semblent variées, représentant accessoirement un frein à leur compréhension détaillée, chaque équipe experte dans le domaine travaillant sur un organisme différent, rendant ainsi difficile le recoupement des informations. Trois organismes ont été particulièrement étudiés et illustrent bien cette disparité des systèmes d'import.

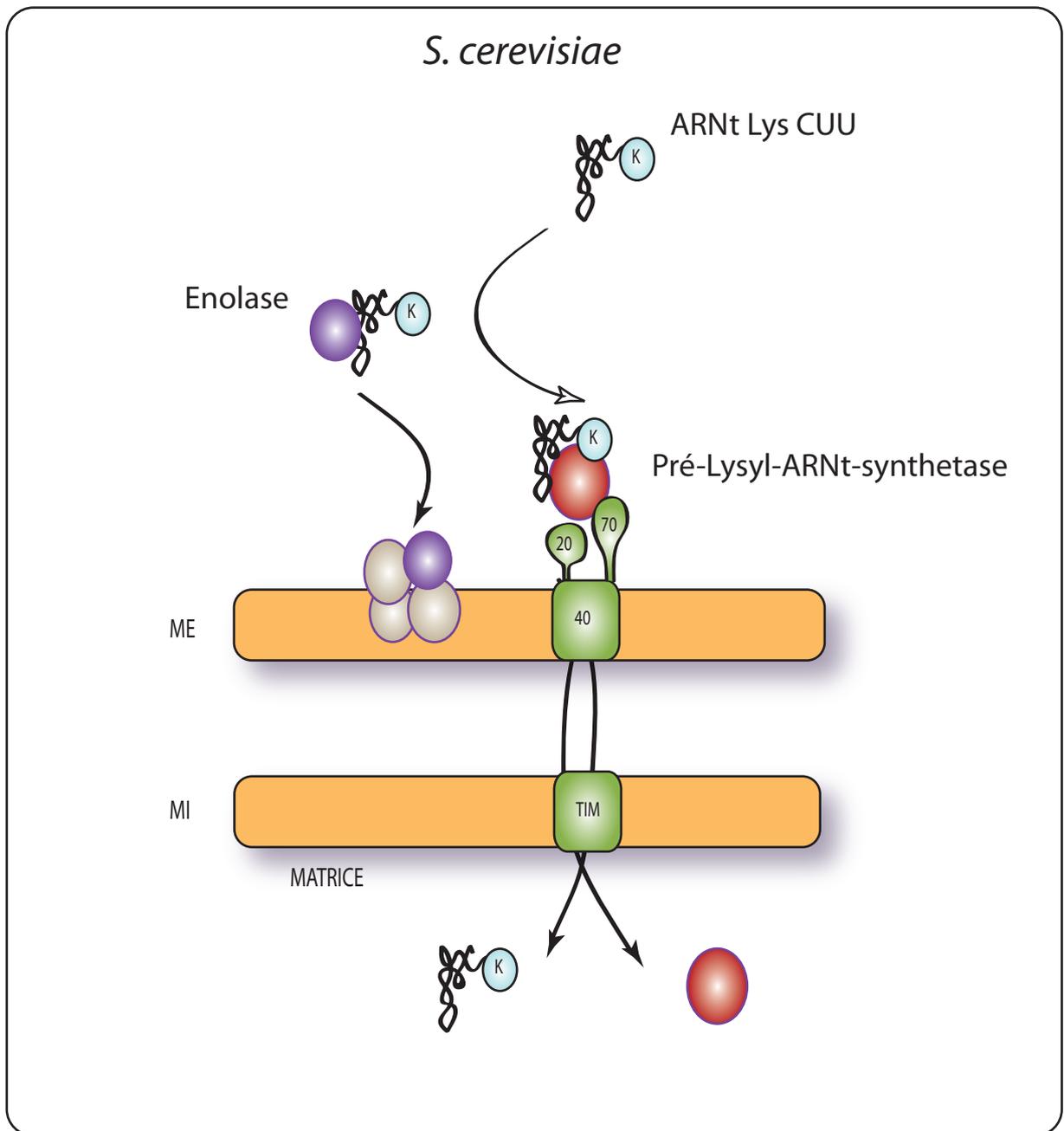
## 2 Exemples de mécanismes d'importation

### 2.1 Mécanisme d'import chez le protozoaire *Leishmania tropica*

L'ADNmt de *Leishmania tropica* ne codant pour aucun ARNt, ils sont tous importés du cytoplasme. Cet import se ferait ici sans facteurs protéiques mais grâce à des déterminants d'importation au niveau du bras D et de l'anticodon (pour des ARNt dits de type I) et au niveau de la boucle variable et de la boucle T (pour des ARNt dits de type II). Les ARNt seraient tout d'abord reconnus par un récepteur de 15 kDa dénommé TAB (Tubulin antisens binding) de la membrane externe. Transloqués à travers cette membrane par un mécanisme inconnu, les ARNt seraient ensuite transportés vers la matrice via un complexe RIC de 640kDa et composé d'au moins 11 sous-unités enchassées dans la membrane interne (Mukherjee et al, 2007) (**Figure 12**).

### 2.2 Mécanisme d'import chez la plante *Solanum tuberosum*

La plante *Solanum tuberosum* importe au moins 6 ARNt du cytoplasme. Leur importation *in vitro* ne nécessite pas de facteurs protéiques mais les études réalisées *in vivo* montrent une corrélation entre aminoacylation et importation mettant en évidence une implication potentielle des aminoacyl-ARNt synthétases. Deux sous-unités du complexe d'import des pré-protéines TOM de la membrane externe semblent être importantes pour reconnaître les ARNt : TOM 20 et TOM 40. Les ARNt seraient ensuite transloqués vers l'espace intermembranaire *via* la porine VDAC. Le mécanisme de translocation de la membrane interne n'est pas connu mais n'impliquerait pas le complexe d'import des pré-protéines TIM (Salinas et al, 2006) (**Figure 12**).



**Figure 13: Mécanisme d'adressage et de translocation de l'ARNt Lys CUU de *S. cerevisiae*.**  
 Adapté de (Salinas et al, 2008)  
 ME: Membrane externe MI: Membrane interne

### 2.3 Mécanisme d'import chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

L'ADN mitochondrial de la levure *Saccharomyces cerevisiae* code en théorie pour tous les ARNt nécessaires pour la traduction mitochondriale. Pourtant, l'import de trois ARNt a été reporté dans la littérature. Le premier est l'ARNt<sup>Lys</sup> CUU dont le mécanisme d'import a été caractérisé en détail au laboratoire. *S. cerevisiae* possède trois ARNt<sup>Lys</sup> : l'ARNt<sup>Lys</sup> CUU (TRK1) et l'ARNt<sup>Lys</sup> UUU (TRK2), tous deux codés par le génome nucléaire, ainsi que l'ARNt<sup>Lys</sup> UUU (TRK3) codé par le génome mitochondrial. L'importation mitochondriale de TRK1 a été reportée il y a plus de 30 ans sans que sa fonction au sein de la mitochondrie soit comprise, TRK3 étant en théorie suffisant pour décoder tous les codons lysines du génome mitochondrial. Des études récentes ont toutefois permis d'expliquer cette apparente redondance : à 37°C la première position de l'anticodon de TRK3 devient hypomodifiée l'empêchant alors de reconnaître le codon lysine AAG, qui est alors décodé par l'ARNt importé TRK1 (Kamenski et al, 2007). Pour être adressé vers la mitochondrie, TRK1 nécessite des protéines qui le dévient de la voie de traduction cytoplasmique. Ainsi, une fois aminoacylé par la lysyl ARNt synthétase cytoplasmique, TRK1 serait reconnu par une des deux isoformes de l'énolase, une enzyme de la glycolyse. Le complexe ainsi formé induirait un changement de conformation de TRK1 ce qui lui permettrait d'interagir avec un second facteur d'import, le précurseur de la lysyl ARNt synthétase mitochondriale (Entelis et al, 2006). La translocation de l'ARNt à travers les deux membranes de la mitochondrie est encore mal comprise mais des études *in vitro* ont montré qu'elle nécessite de l'ATP, un potentiel transmembranaire et que le canal d'importation des pré-protéines soit intact (Tarassov et al, 1995) (**Figure 13**).

L'import de deux autres ARNt, l'ARNt<sup>Gln</sup> CUG et l'ARNt<sup>Gln</sup> UUG, a également été reporté *via* un mécanisme différent de TRK1 puisqu'il ne semble nécessiter ni aminoacylation ni aucun facteur d'import (Rinehart et al, 2005). Il est toutefois à noter que n'ayant pas pu être reproduite dans une étude récente cette importation est donc aujourd'hui sujette à caution (Frechin et al, 2009).

### 3 Importation d'ARN dans les mitochondries humaines.

Du fait que l'ADNmt des mammifères code pour les 22 ARNt qui lui sont nécessaires lors de la traduction, il a longtemps été admis que le phénomène d'importation d'ARN dans les mitochondries y était inexistant. Toutefois, cette déduction a été remise en cause ces dix dernières années par le report de 4 espèces d'ARN différents susceptibles de subir une translocation vers les mitochondries humaines. De plus le mode de translocation de ces ARN a très récemment été partiellement caractérisé : il impliquerait la polynucleotide phosphorylase PNPASE, une 3'-5' exoribonuclease présente dans l'espace inter membranaire (Wang et al, 2010).

Le premier ARN dont on a suspecté l'importation est le composant de la RNase P, une endoribonucléase qui catalyse la maturation en 5' des ARNt. Alors que son gène est codé par bon nombre de génomes mitochondriaux, il s'avère ne pas l'être par l'ADNmt des mammifères. Il a été montré que l'activité de la Rnase P purifiée à partir de mitochondries humaines était sensible à la nucléase micrococcale laissant supposer que son ARN était d'origine nucléaire (Doersen et al, 1985) et que la séquence de ce dernier est identique à celle de l'ARN H1 de la RNase P nucléaire (Puranam & Attardi, 2001). Bien que des études récentes sur le sujet semblent démontrer que la RNase P mitochondriale est exclusivement composée de protéines (Holzmann et al, 2008), l'import de l'ARN de la RNase P nucléaire a été caractérisé dans les études montrant l'implication de la PNPASE dans l'import des ARN (Wang et al, 2010), laissant supposer que deux types de Rnase P coexistent dans les mitochondries.

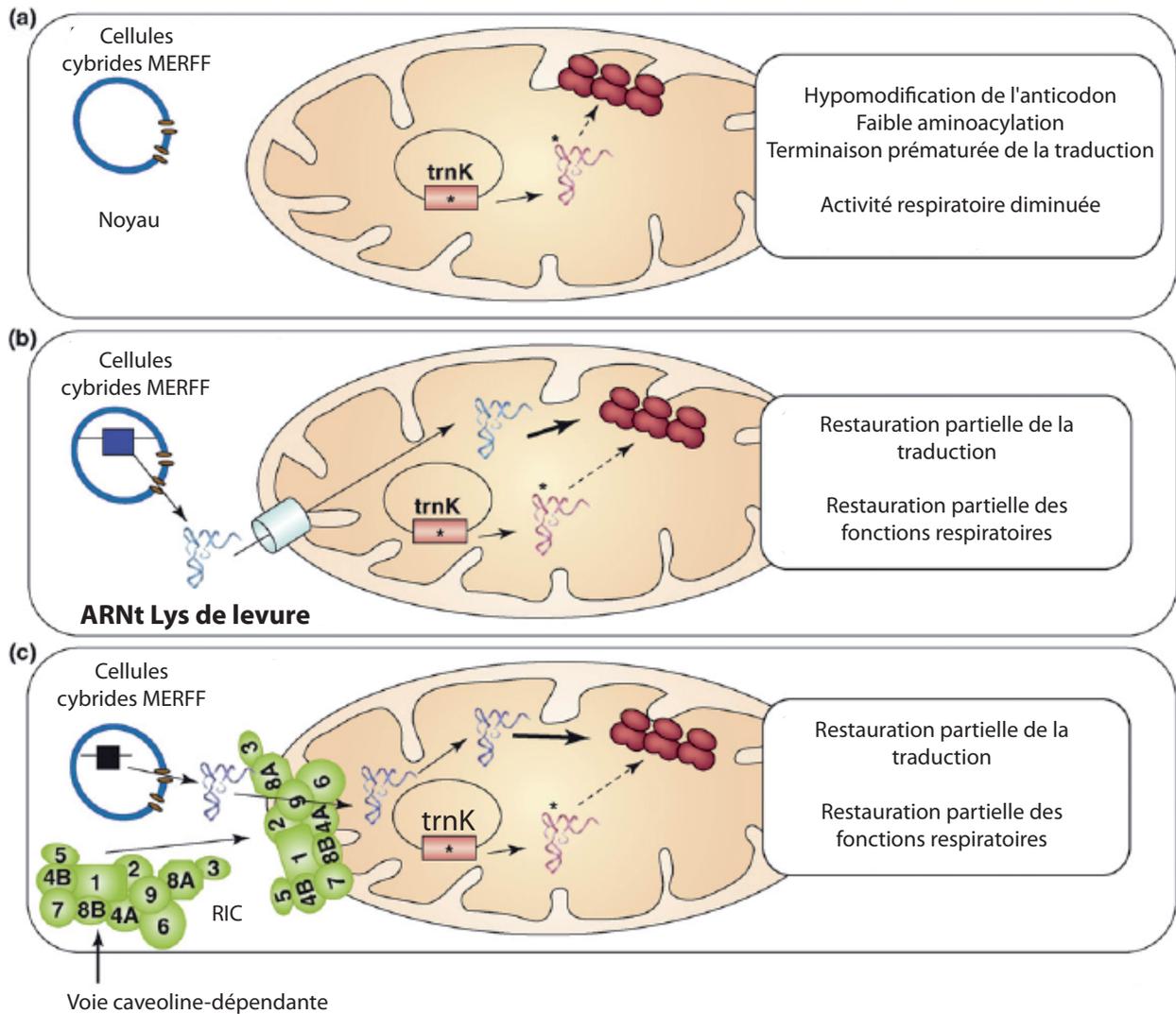
Le second ARN suspecté d'être importé est le composant de la RNase MRP (Mitochondrial RNA Processing). C'est une endoribonucléase site spécifique dont le rôle est d'effectuer le clivage de l'amorce d'ARN lors de la réplication de l'ADNmt. La quantité de cet ARN trouvé dans les mitochondries étant très faible (Chang & Clayton, 1987) elle pourrait équivaloir à une contamination par de l'ARN du cytosol ou du noyau (Kiss & Filipowicz, 1992). Toutefois, des expériences de réplication *in vitro* ont montré que cet ARN est requis pour la réplication de l'ADNmt. L'hypothèse a donc été émise que *in vivo* la réplication de l'ADNmt nécessitait un très faible nombre de molécules par génome mitochondrial. De plus, la présence d'ARN MRP a été démontrée par des analyses quantitatives des ARN

mitochondriaux dans des cellules HeLa (Puranam & Attardi, 2001) ainsi que très récemment dans une RNase MRP mitochondriale hautement purifiée (Lu et al, 2010).

Le troisième ARN qui s'est avéré être importé dans les mitochondries est l'ARN ribosomal 5S (ARNr 5S). Tout comme l'import des deux précédents ARN, celui de l'ARNr 5S a été controversé mais aujourd'hui établi sans ambiguïté (Smirnov et al, 2008). La controverse est née du fait que la présence de l'ARNr 5S n'a jamais pu être détectée dans les ribosomes mitochondriaux humains, posant la question de l'utilité de son importation. Des études réalisées au laboratoire ont toutefois montré que le nombre d'ARNr 5S importé était suffisant pour se lier à tous les mitoribosomes (Entelis et al, 2001). L'isolation des ribosomes mitochondriaux étant de plus une procédure compliquée, il est possible que l'ARNr 5S ait été perdu en cours de route. Son mécanisme d'import a été partiellement élucidé par des études *in vitro* et *in vivo* : tout comme l'import de TRK1 chez la levure elle nécessiterait la présence d'ATP, d'un potentiel transmembranaire et de facteurs cytosoliques solubles. Un de ces facteurs a été récemment caractérisé au laboratoire: il s'agirait de la rhodanèse, une sulfurtransferase mitochondriale (Smirnov et al, 2010).

Le quatrième type d'ARN a avoir été reporté comme étant importé dans les mitochondries humaines sont les ARNt<sup>Gln</sup> CUG et UUG. Tout comme leur import chez *Saccharomyces cerevisiae*, cette importation ne nécessiterait pas de facteurs protéiques et serait distincte de la voie d'import des pré-protéines (Rubio et al, 2008).

A coté de ces ARN naturellement importés, il a également été démontré que les mitochondries humaines étaient capables d'importer des ARNt d'espèces différentes. Plusieurs maladies mitochondriales étant dues à des mutations dans les ARN de transfert mitochondriaux, cet état des faits a été mis à profit à des fins thérapeutiques. En important des ARNt non mutés dans la mitochondrie il pourrait donc être possible de compléter la mutation et de restaurer les fonctions de la chaîne respiratoire. Cette stratégie, similaire à la stratégie allotopique des protéines, a été testée avec succès dans deux études différentes.



**Figure 14: Stratégies thérapeutiques utilisant la voie d'import des ARN dans les mitochondries. Adapté de (Salinas et al, 2008)**

## 4 Stratégies thérapeutiques reposant sur la voie d'importation des ARNmt

Les deux études réalisées se sont basées sur le même modèle : la mutation A8344G de l'ARNt<sup>Lys</sup> mitochondrial associée au syndrome MERRF. Cette mutation induit une hypomodification de l'anticodon et une faible efficacité d'aminocyclation (**Figure 14A**).

Le premier modèle repose sur la compréhension des mécanismes d'importation chez *Leishmania tropica*. Les auteurs ont réussi à faire rentrer le complexe protéique RIC dans des cellules cybrides porteuses de la mutation MERFF *via* la voie d'endocytose caveoline dépendante. En s'intégrant dans la membrane interne par un mécanisme inconnu ce complexe a permis l'importation d'ARNt cytosoliques humains dont l'ARNt<sup>Lys</sup> permettant de restaurer les fonctions respiratoires de la mitochondrie (Mahata et al, 2006) (**Figure 14C**). Il est à noter qu'en dehors de cet objectif thérapeutique la même stratégie a été utilisée cette fois-ci pour importer des séquences anti-sens fusionnées au bras D de l'ARNt<sup>Tyr</sup> de *Leishmania tropica* (caractérisé précédemment comme un déterminant d'importation) ce qui a conduit à la dégradation spécifique des ARN messagers ciblés et à la baisse du taux des protéines correspondantes (Mukherjee et al, 2008). Si les auteurs soulignent le potentiel du complexe RIC pour le traitement d'un large spectre de maladies mitochondriales ces études soulèvent toutefois plusieurs questions méthodologiques notamment concernant le mécanisme d'isolement, de renaturation et d'insertion dans la membrane interne d'un complexe multiprotéique de près de 600 kDa qu'est le complexe RIC.

Le second modèle repose quant à lui sur la compréhension des mécanismes d'importation chez *Saccharomyces cerevisiae*. En transfectant des cellules humaines par des plasmides permettant l'expression de TRK1, TRK2 et TRK3 de levure, l'import de TRK1 et de TRK3 dans les mitochondries humaines a pu être observé (Kolesnikova et al, 2000). Ces résultats ont permis de montrer qu'il était possible d'importer des ARNt d'une autre espèce dans les mitochondries humaines et que la spécificité d'import était préservée puisque TRK2, non importé dans les mitochondries de levure, ne l'était pas non plus chez l'humain. Des études de mutagenèse dirigée ont permis de montrer que les paires de bases G1-C72 et U73 du bras accepteur jouaient le rôle de déterminants pour l'import de TRK1 (Entelis et al, 1998).

En introduisant ces bases dans la structure de TRK2, il est alors possible d'importer celui-ci dans les mitochondries de levure et humaines. Cette version mutée de TRK2 ainsi que TRK3 tous deux porteurs d'un anti codon UUU ont été exprimés dans des cellules cybrides et des fibroblastes de patients pour compléter l'ARNt<sup>Lys</sup> muté du syndrome MERFF. Les résultats ont montré que les ARNt importés étaient correctement aminoacylés, capables de participer à la traduction mitochondriale et restauraient partiellement les capacités respiratoires (Kolesnikova et al, 2004) (**Figure 14B**).

Ces deux études démontrent que la voie d'import d'ARN dans les mitochondries peut être exploitée pour pallier aux effets pathogéniques des mutations dans les ARNt mitochondriaux.

# **PROJET DE THESE**



Mon projet de thèse s'inscrit dans la lignée des travaux réalisés ces dernières années au laboratoire, consistant à mettre à profit les connaissances acquises sur le mécanisme d'importation des ARN dans les mitochondries pour tenter de mettre au point de nouvelles pistes de thérapies géniques pour les maladies mitochondriales. La voie d'import des ARN a jusqu'à ce jour été utilisée pour mettre au point des stratégies thérapeutiques de type allotopiques. L'objectif de cette thèse a été de modéliser cette fois-ci un essai de thérapie anti-génomique dans des cellules humaines en culture en testant si le taux d'hétéroplasmie pouvait être diminué en important des oligonucléotides au potentiel anti-réplicatif par la voie d'import des ARN. En se basant sur les déterminants de l'ARNt<sup>Lys</sup> CUU de levure, un petit ARN artificiel F1D1 a été construit avant mon arrivée au laboratoire et a servi de point de départ à mon travail de thèse dont les objectifs sont les suivants :

- Modéliser des ARN au potentiel anti-réplicatif en introduisant des oligonucléotides complémentaires aux molécules d'ADNmt mutées à la structure de F1D1.
- Evaluer le potentiel des ARN recombinants sur la réplication *in vitro* de fragments d'ADNmt mutés.
- Tester la stabilité des ARN recombinants, leur import dans les mitochondries et enfin leur effet sur le taux d'hétéroplasmie dans des cellules humaines en culture.



## **RESULTATS ET DISCUSSION**



# I Caractérisation d'un nouvel ARN comme substrat d'importation dans les mitochondries humaines.

## 1 Etude des déterminants d'importation de l'ARNt<sup>Lys</sup> CUU de la levure *S. cerevisiae*

Avant mon arrivée au laboratoire, des travaux avaient été entrepris pour tenter de comprendre les mécanismes moléculaires qui sous-tendent à la sélectivité de l'import mitochondrial de l'ARNt<sup>Lys</sup> CUU « TRK1 » de la levure *S. cerevisiae* par rapport à l'ARNt<sup>Lys</sup> UUU « TRK2 » qui ne l'est pas. Des études de mutagenèse dirigée avaient permis de montrer que la paire de bases G1-C72 et la base U73 du bras accepteur et la base C34 de l'anticodon jouaient le rôle de déterminants pour l'import de TRK1 (Kazakova et al, 1999). Leur rôle dans la spécificité d'import de TRK1 n'étant pas claire, une approche de sélection *in vitro* par Selex (systematic evolution of ligands by exponential enrichment) a ensuite été utilisée pour compléter ces travaux. Les résultats de cette étude, résumés ci-dessous, sont présentés dans la publication n°1 page 51 (Kolesnikova et al, 2010). Une librairie d'ARN dont les séquences étaient basées sur celles de TRK1 contenant des nucléotides aléatoires dans 14 positions différant de TRK2 a été construite par PCR et T7- transcription *in vitro*. Les ARN obtenus ont été sélectionnés pour leur affinité pour la pré-lysyl-ARNt synthétase de levure pré-MSK1p et pour leur efficacité d'importation dans les mitochondries isolées de levure. Ces tests d'import *in vitro* ont été élaborés au laboratoire et consistent à incuber les ARN marqué au <sup>32</sup>P durant 10min à 34°C en présence de mitochondries isolées et de protéines cytosoliques solubles. L'ARN non importé est ensuite dégradé par des RNases. Les mitochondries sont centrifugées et lysées pour récupérer l'ARN importé qu'elles contiennent. L'ARN extrait est ensuite mis à migrer sur gel et la bande d'ARN importé est révélée par autoradiographie. La comparaison de l'intensité de cette bande avec celle correspondant à un pourcentage donné d'ARN présent dans le milieu de départ permet de calculer l'efficacité de l'importation.

Après plusieurs cycles d'enrichissement les versions individuelles sélectionnées importées avec une très grande efficacité dans les mitochondries isolées de levure ont été séquencées et leur structure secondaire prédite par le logiciel MFold. Ces analyses ont permis d'aboutir au résultat surprenant que la majorité des aptamères obtenus avaient conservés la partie 3'-terminale (boucle T comprise) et 5'-terminale (bras D) de TRK1 mais avaient perdu

la partie centrale de la molécule ( bras de l'anticodon et boucle V). De façon intéressante un réarrangement structural au niveau de la partie 3' du bras accepteur et d'une partie de la boucle T conduisant à la formation d'une hélice alternative dénommée F a été prédite par Mfold dans tous les aptamères obtenus. La formation de cette hélice a ensuite été caractérisée par des expériences de FRET (Fluorescence résonance energy transfert) consistant à lier un fluorophore au niveau de la base C56 et A75 de TRK1 ce qui permet d'estimer la distance qui sépare les deux fluorophores selon le signal de quenching obtenu. Réalisées en présence d'énolase ou de pré-MSK1p, les facteurs d'import, ces expériences ont permis de montrer que l'énolase semblait induire un changement de conformation de TRK1 correspondant à la formation de l'hélice alternative F. En complexe avec la pré-MSK1p, la distance calculée entre les deux fluorophores ne permet pas de conclure à la présence de l'hélice F mais la conformation semble toutefois différente de la conformation en forme de L classiquement adoptée par les ARNt. Le modèle proposé est que l'énolase distinguerait TRK1 des autres ARNt par sa capacité à former l'hélice F induisant un réarrangement entier de la molécule à l'exception du bras D. Cette conformation serait alors reconnue par la pré-MSK1p et permettrait son adressage dans la mitochondrie.

Cette étude montre pour la première fois qu'un réarrangement structural pourrait être à la base de la sélectivité d'import des ARNt dans les mitochondries.

## **2 Création d'un ARN artificiel importable dans les mitochondries humaines**

Outre la compréhension des mécanismes moléculaires qui président à la sélectivité de l'import de TRK1 dans les mitochondries de levure, ces résultats nous ont permis de construire une nouvelle version d'ARN importée avec une très grande efficacité dans les mitochondries de levures et humaines *in vitro*. Ainsi, en fusionnant l'hélice F au bras D de TRK1 (retenus dans la plupart des aptamères sélectionnés par Selex), une efficacité d'import supérieure à ces deux domaines isolés et de 10X supérieure à TRK1 a été obtenue dans des mitochondries isolées en présence d'extraits protéiques. C'est ce petit ARN de 39 bases, appelé F1D1, qui a été à la base de mes travaux de thèse.

Ma contribution à l'article présentant ces travaux a consisté à caractériser l'import de F1D1 cette fois ci *in vivo* dans des cellules hépatiques immortalisées dénommées HepG2. En effet si les résultats obtenus *in vitro* sont encourageants ils n'en restent pas moins qu'ils sont

réalisés dans un contexte artificiel et que l'importation des ARN dans un contexte cellulaire peut s'avérer différente.

La méthode utilisée ici consiste à transfecter les cellules par lipofection avec l'ARN F1D1 puis à isoler les ARN contenus dans les mitochondries. Ces dernières sont auparavant traitées avec des RNases pour dégrader les ARN cytosoliques et avec de la digitonine pour éliminer la membrane externe de la mitochondrie et de ce fait les ARN en contact avec elle. Les ARN récupérés sont ensuite analysés par hybridation Northern. L'objectif de ce test est double : d'une part vérifier la présence des ARN étudiés dans la fraction mitochondriale pure, et d'autre part évaluer et comparer leurs efficacités d'import respectives. Pour ce faire, trois types de sondes sont utilisées, ciblant les ARN utilisés pour la transfection, un ARN mitochondrial et un ARN cytosolique. La sonde s'hybridant aux ARN cytosoliques permet de vérifier la pureté de la fraction mitochondriale. La sonde contre les ARN mitochondriaux permet quant à elle de calculer l'efficacité d'import, correspondant à la quantité d'ARN exogène présent dans la mitochondrie par rapport à la quantité présente dans la cellule.

Les résultats obtenus sont en corrélation avec les tests d'import *in vitro* puisque non seulement l'ARN artificiel F1D1 est importé mais l'on observe également une augmentation de l'efficacité d'import de F1D1 par rapport à TRK1 (environ 5 fois supérieure). En se basant sur les déterminants d'importation d'un ARN naturellement importé cette étude a donc permis de mettre au point un nouvel ARN potentiellement utilisable comme vecteur pour une application thérapeutique.



### 3 Article n°1

**Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria.**

Kolesnikova O, Kazakova H, Comte C, Steinberg S, Kamenski P, Martin RP, Tarassov I, Entelis N. RNA. 2010 May;16(5):926-41.



# Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria

OLGA KOLESNIKOVA,<sup>1,2</sup> HELENA KAZAKOVA,<sup>1,2</sup> CAROLINE COMTE,<sup>1</sup> SERGEY STEINBERG,<sup>3</sup> PIOTR KAMENSKI,<sup>1,2</sup> ROBERT P. MARTIN,<sup>1</sup> IVAN TARASSOV,<sup>1</sup> and NINA ENTELIS<sup>1</sup>

<sup>1</sup>UMR 7156, Université de Strasbourg/Centre National de la Recherche Scientifique (Uds/CNRS), 67084 Strasbourg, France

<sup>2</sup>Department of Molecular Biology, Moscow State University, Moscow 119899, Russia

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, Montreal University, Montreal H3C3J7, Canada

## ABSTRACT

In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, nuclear DNA-encoded tRNA<sub>CUU</sub><sup>Lys</sup> is partially imported into mitochondria. We previously found that the synthetic transcripts of yeast tRNA<sup>Lys</sup> and a number of their mutant versions could be specifically internalized by isolated yeast and human mitochondria. The mitochondrial targeting of tRNA<sup>Lys</sup> in yeast was shown to depend on the cytosolic precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase and the glycolytic enzyme enolase. Here we applied the approach of in vitro selection (SELEX) to broaden the spectrum of importable tRNA-derived molecules. We found that RNAs selected for their import into isolated yeast mitochondria have lost the potential to acquire a classical tRNA-shape. Analysis of conformational rearrangements in the importable RNAs by in-gel fluorescence resonance energy transfer (FRET) approach permitted us to suggest that protein factor binding and subsequent import require formation of an alternative structure, different from a classic L-form tRNA model. We show that in the complex with targeting protein factor, enolase 2, tRK1 adopts a particular conformation characterized by bringing together the 3'-end and the TΨC loop. This is a first evidence for implication of RNA secondary structure rearrangement in the mechanism of mitochondrial import selectivity. Based on these data, a set of small RNA molecules with significantly improved efficiency of import into yeast and human mitochondria was constructed, opening the possibility of creating a new mitochondrial vector system able to target therapeutic oligoribonucleotides into deficient human mitochondria.

**Keywords:** mitochondrial tRNA import; RNA aptamers; small synthetic RNAs; SELEX; in-gel FRET

## INTRODUCTION

Mitochondrial import of nuclear DNA-encoded tRNAs is a widespread phenomenon. It was characterized in a variety of species, and apparently unrelated molecular mechanisms have been discovered for protozoa, higher plants, and yeast (for review, see Tarassov et al. 2007; Salinas et al. 2008; Duchene et al. 2009). In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, cytosolic tRNA<sub>CUU</sub><sup>Lys</sup> (hereafter referred to as tRK1) is partially targeted into mitochondria (Martin et al. 1977). This process was shown to be essential for mitochondrial protein synthesis at elevated temperatures, when the mitochondrially encoded tRNA<sub>U\*UU</sub><sup>Lys</sup> becomes undermodified at the wobble position of the anticodon and thus can no longer recognize the lysine codon AAG (Kamenski et al.

2007). Import of two other cytosolic tRNAs, tRNA<sub>CUG</sub><sup>Gln</sup> and tRNA<sub>UUG</sub><sup>Gln</sup>, proposed to be essential for decoding of CAG glutamine codon (Rinehart et al. 2005), however, was not detected in yeast mitochondria in a more recent study (Frechin et al. 2009). It has long been believed that human mitochondria do not import tRNAs; however, import of nucleus-encoded tRNA<sup>Gln</sup> in human and rat mitochondria was recently reported (Rubio et al. 2008). Previously we demonstrated that human mitochondria are able to import yeast tRK1 (Kolesnikova et al. 2000), and this artificially established import was successfully used for a partial rescue of the dysfunctions associated with MERRF mutation in the mtDNA (Kolesnikova et al. 2004).

The molecular mechanism of tRK1 mitochondrial targeting in yeast involves an interaction with protein factors that enables the RNA to escape the cytosolic protein synthesis cycle. We have previously shown that a part of aminoacylated cytosolic tRNA<sub>CUU</sub><sup>Lys</sup> can be specifically recognized by one of the two isoforms of the glycolytic enzyme enolase, Eno2p (Entelis et al. 2006). This tRNA–enolase complex then transits to the mitochondrial surface, where

**Reprint requests to:** Nina Entelis, UMR 7156, Université de Strasbourg/Centre National de la Recherche Scientifique (Uds/CNRS), 21 rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France; e-mail: N.Entelis@ibmc.u-strasbg.fr; fax: +33 3-88-41-70-70.

Article published online ahead of print. Article and publication date are at <http://www.rnajournal.org/cgi/doi/10.1261/rna.1914110>.

enolase can be incorporated into a glycolytic multiprotein complex (Brandina et al. 2006), whereas tRK1 is taken up by the precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase, preMSK1p, which serves as the carrier for tRK1 translocation into the mitochondrial matrix (Tarasov et al. 1995). In this interplay between two proteins, enolase was hypothesized to function as an RNA chaperone, increasing the affinity of tRK1 for preMSK1p (Entelis et al. 2006); however, the details of this mechanism remained unclear.

Interaction of imported tRNA with protein factors is a key moment for the selectivity of the mitochondrial import. The molecular mechanism of discrimination between imported tRK1 and all the other cytosolic tRNAs was still unknown. Using mutagenesis followed by *in vitro* and *in vivo* import assays, we have previously found that not only is tRK1 imported into yeast mitochondria, but also several of its mutant versions, mutants of the second cytosolic lysine isoacceptor tRNA, normally nonimported tRNA<sup>Lys</sup><sub>U\*UU</sub> (tRK2), and even a synthetic transcript of the mitochondrially localized tRNA<sup>Lys</sup><sub>U\*UU</sub> (tRK3) (Entelis et al. 1996, 1998; Kolesnikova et al. 2002). Systematic analysis of the sequences of imported versions permitted us to discern the determinants (the first base pair G1-C72 and U73 in the acceptor stem and C34 in the anticodon) and an anti-determinant (modified U34) that controls mitochondrial import specificity (Fig. 1A). However, these determinants can be considered as context-dependent. For example, insertion of a base C in the wobble position of the normally nonimported tRK2 leads to its import, which means that this position may be a part of the import signature. On the other hand, substitution of C34 in tRK1 by U34 (as in tRK2) does not affect the import, only replacement of all the anticodon arm of tRK1 by that of tRK2 results in such an inhibition (Entelis et al. 1998). Furthermore, it was shown that replacement of bases in the middle of the AA-stem blocks preMSK1p binding and the import of tRK1 but does not lead to import of tRK2 (Kazakova et al. 1999). These results raised the question, to what extent may the import machinery be flexible, and is it possible to discern the import signature, in terms of sequence motif(s) or structural elements? Here we address this question by using the approach of *in vitro* selection (systematic evolution of ligands by exponential [SELEX] enrichment) (Tuerk and Gold 1990). Based on these data, a set of small RNA molecules with significantly improved efficiency of import into yeast and human mitochondria was constructed, opening the possibility of creating a new mitochondrial vector system able to target therapeutic oligoribonucleotides into deficient human mitochondria.

Analysis of all importable RNAs obtained in selection experiments allows us to suggest that at least one of the tRNA mitochondrial import determinants consists in the possibility of forming an alternative structure, different from a classic L-form tRNA model. To prove the real existence of such a conformational rearrangement, we used the *in-gel* fluorescence resonance energy transfer (FRET) approach (Radman-Livaja et al. 2005). We show that in the

complex with the targeting protein factor enolase, tRK1 adopts a particular conformation characterized by bringing together nucleotides C56 and A75. This is a first evidence for implication of RNA secondary structure rearrangement in the mechanism of mitochondrial import selectivity.

## RESULTS

### Strategy for RNA selection from libraries of randomized RNAs

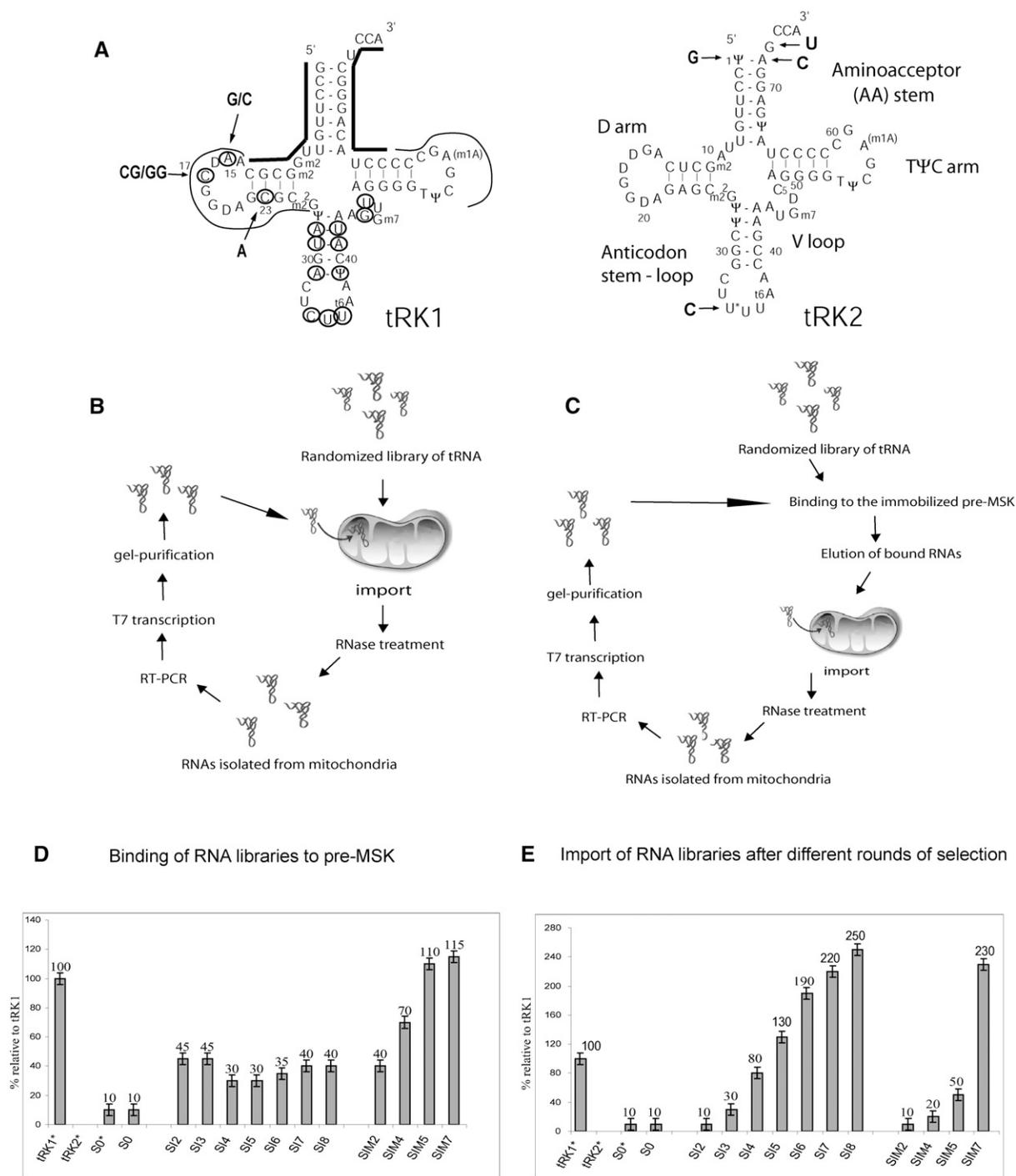
The initial RNA library was generated by T7 transcription on a 73-mer oligonucleotide corresponding to yeast tRNA<sup>Lys</sup><sub>CUU</sub> (tRK1) that contained 14 random nucleotides in positions that differ between imported tRK1 and nonimported tRNA<sup>Lys</sup><sub>U\*UU</sub> (tRK2); the three anticodon nucleotides were also randomized (Fig. 1A; Table 1). The resulting library therefore contained  $2.7 \times 10^8$  possible sequences. This library was subjected to selection assays using two strategies (Fig. 1B,C).

The first one was to select RNAs by several rounds of import into isolated yeast mitochondria followed by RT-PCR amplification of RNA purified from RNase-treated mitochondria (selection for import [SI]) (Fig. 1B). Thus, we selected RNAs capable of entering into the mitochondria and remaining stable there for at least 1 h.

The second strategy was to select RNAs for preMSK1p-binding ability prior to the mitochondrial import in each round of amplification (selection for import and preMSK1p affinity [SIM]) (Fig. 1C). The specificity of RNA binding to immobilized preMSKp was verified by comparison of aminoacylated tRK1 binding versus tRK2 (Fig. 1D). Our previous results indicated that aminoacylation of tRK1 is a prerequisite to allow interaction with preMSK1p; however, some mutant forms of the tRK1 acquired preMSK1p-binding capacities in their deacylated form (Entelis et al. 1998). Our randomized RNA library (S0) was shown to have the same low pre-MSK-binding capacity either with or without pre-aminoacylation by yeast cytoplasmic LysRS (KRS1p). Therefore, we made the further selection experiments without aminoacylation of RNA libraries prior to preMSK1p binding, thus selecting the RNAs able to bind preMSK1p in their deacylated form.

### Characterization of different pools of selected RNAs

After each cycle of selection, an aliquot of every RNA pool was analyzed for preMSK1p binding and import capacity (Fig. 1D,E). The initial RNA library (pool S0) was characterized by a very low level of import. In the RNA pools of the SI series, we observed an increase of import capacity. Already at cycle 5, the import efficiency was similar to that of tRK1, while the average import efficiency of the RNA pool after the eighth cycle was 2.5 times higher than that of tRK1. Thus, the enhancement of import from S0 to SI8 RNA pools was about 30-fold. PreMSK1p-binding capacities of all SI libraries were rather low, as expected in the absence of selective pressure.



**FIGURE 1.** (A) Cloverleaf structures of yeast lysine tRNAs, partially imported into mitochondria tRK1 and nonimported tRK2. The import determinants identified previously are indicated by arrows on the tRK2 structure. The tRK1 regions determined by oligonucleotides used for RT-PCR are shown by bold lines, residues that have been randomized for SELEX experiment are circled, and regions conserved in all the selected RNA aptamers are indicated by thin lines. Selected substitutions in the D-arm of tRK1 are shown by arrows. (B,C) Strategy for in organello RNA selection. Scheme of randomized RNA library selection (B) for import into isolated yeast mitochondria and (C) for both affinity to preMSK1p and mitochondrial import. (D,E) Characterization of RNA pools resulting from different rounds of selection: (D) preMSK1p-binding capacity; (E) efficiency of mitochondrial import, in percent relative to tRK1. (S0) Initial RNA library; (S12–S18) RNA pools after two to eight rounds of selection for the import into mitochondria; (SIM2–SIM7) RNA pools after two to seven rounds of selection for preMSK1p binding and mitochondrial import. RNAs marked with \* were aminoacylated prior to the test. All experiments were performed at least twice in an independent way; standard deviations values are indicated.

TABLE 1. Sequence alignments and import properties of yeast tRNA<sup>Asp</sup> and selected RNA aptamers

RNA	Sequence	Import, fmoles RNA/0.1 mg of mt protein	Mfold predicted dG of F-type structure, kcal/mol	Mfold predicted dG of A-type structure, kcal/mol
tRK1	1 15 17 23 34 56 73 gccttggttggcgcaAtC--ggtag-Cgc---gtATgActCTTaaTcaAT---aaGgtTtaggggttcgag-cccctacagggctcca	50±5	-28.5	-27.5
SI-8-19	gccttggttggcgcaGtGG-ggtag-AgCC--gtCAGgctATCaAcCG--aTTgtAa---gttcgag-cccctacagggctcca	140±7	-28.8	-26.8
SI-8-56	gccttggttggcgcaGtCG-ggtag-AgCC--gtCAGgctATCaAcCG--aTTgtAa---gttcgag-cccctacagggctcca	190±10	-32.6	-30.5
SI-8-61	gccttggttggcgcaGtCGGGgtag-AgCC--gtCAGgctATCaAcCG--aTTgtAa---gttcgag-cccctacagggctcca	150±10	-33.0	-30.9
SIM-7-18	gccttggttggcgcaCtG--ggtagGAgc---gt-----AaaCc-----gaGccccctacagggctcca	240±15	-18.0	-17.9
SIM-7-30	gccttggttggcgcaCtA--ggtta--AgcAGCgt-----c--CccG---aa-----cgag-cccctacagggctcca	230±12	-17.4	-16.3
SIM-7-33	gccttggttggcgcaCtG--ggttag-Agc---gt-t--c-c--GGcTt-----ccc-----cgag-cccctacagggctcca	180±10	-24.7	-23.7
SIM-7-81	gccttggttggcgcaCtA--ggttagCA-c---gt-----c-c--GG-cTtCCaaCCCC-----cgagCccctacagggctcca	250±15	-20.6	-19.1
SIM-7-92	gccttggttggcgcaGtC--ggttag---c---gtatTaGGct-GG-c-----aaCCCCCCC-----cgag-cccctacagggctcca	220±12	-22.5	-20.6
tRK2	TccttggttAgcTcaGtT--ggttag-Agc---gtTCggctTTTaaCcgA---aaTgtCaggggttcgag-cccctaTGagggAgcca	0	Not found	-27.8
tRK2(UIG; A72C;G73U)	GccttggttAgcTcaGtT--ggttag-Agc---gtTCggctTTTaaCcgA---aaTgtCaggggttcgag-cccctaTGagggctcca	50±5	-23.6	-25.9

Regions designed by oligonucleotides used for amplification are underlined; sequences corresponding to the D-arm of tRNA are shown in bold; nucleotides randomized in the initial RNA library are in capital letters. (SI-8) Aptamers from the RNA pool obtained after eight rounds of selection for mitochondrial import only; (SIM-7) aptamers from the pool SIM-7, selected for both the import and pre-MSK-binding capacities.

In the SIM series, the efficiency of import increased only slightly from the second to the fifth cycle. We therefore changed the conditions of RNA selection to make them more stringent by decreasing the concentration of mitochondria in the import mixture and, indeed, obtained a 2.3-fold increase of import efficiency in comparison with tRK1 at the seventh cycle. As opposed to the SI series, the SIM one was characterized by a gradual increase of preMSK1p-binding ability to reach the affinity comparable to that of tRK1 already at the fifth round of selection (Fig. 1D).

### Analysis of individual aptamers

Resulting RT-PCR amplified pools after the eighth round of selection in the SI series (named SI-8) and after the seventh round in the SIM series (SIM-7) have been cloned, and 25–35 plasmids from each library were sequenced. All the sequences of selected RNAs were thoroughly analyzed for the presence of characteristic motifs and highly conserved nucleotides. Surprisingly, most of the RNA aptamers contained large deletions and rearrangements compared with the tRK1 molecule. We obtained a set of molecules containing the aminoacceptor (AA) stem of tRK1 determined by oligonucleotides used for RT-PCR, conserved regions corresponding to D-loops and T-loops, and variable sequences in the middle part of the molecule (Fig. 1A; Table 1).

Examples of selected RNAs from the SI-8 pool (selection for mitochondrial import only) shown in Table 1 represent the most frequently found sequences—SI-8-56 corresponds to 40% of all the aptamers, and SI-8-19 and SI-8-61 to 10% of each one. Statistical analysis of randomized nucleotides in the D-stem–loop region revealed the selected substitutions of several bases (Fig. 1A; Table 2): A15 (in tRK1) to G (as in tRK2); C17 (in tRK1) to GG/CG (U in tRK2); and C23 (in tRK1) to A (as in tRK2). The last substitution should severely disturb the D-stem stability. The sequence

of the next 21 bases that should correspond to the anticodon arm–variable loop region of tRNA was the same in 65% of the aptamers of SI series, however, being quite deviant from the tRK1 sequence (Table 1).

We have not found any conservation in the anticodon region. This is in agreement with our results obtained by directed mutagenesis, suggesting that substitutions in the anticodon bases may modulate the import efficiency but do not abolish it (Kolesnikova et al. 2002). The sequence of the T-loop of tRK1 was conserved in all the aptamers, but the stretch of Gs that made the 5'-strand of the T-stem in tRK1 was deleted, thus making the formation of the normal T-stem impossible. Interestingly, another stretch of Gs has appeared in a different part of the sequence, namely, in the middle of the D-loop, due to a change of C17 to CG/CGG/GG (Tables 1, 2).

The aptamers selected for import and pre-MSK-binding capacities (pool SIM-7) were all different, characterized by smaller lengths (57–65 nucleotides [nt]) and the presence of AC-rich stretches in the middle part of the molecule, replacing the anticodon–V-loop region of tRK1. Nucleotide substitutions in the D-loop region were partially different from those found in the SI pool: A15 has turned to C, and C17 to G/A (Tables 1, 2).

Several versions of the SI and SIM selection series were tested for mitochondrial import into isolated yeast mitochondria (Table 1). All of them were shown to have very high import efficiencies (three to five times higher than that of tRK1), thus validating our selection strategies and demonstrating the possibility of mitochondrial import for RNAs that have little in common with tRK1 structure.

### Structural features of selected RNAs

Secondary structure predictions indicate that all the RNAs selected for mitochondrial targeting are quite deviant from the standard tRNA cloverleaf model.

**TABLE 2.** The frequency of bases in randomized positions of the D-arm region of RNA aptamers issued from the third (SI-3, SIM-3) and the final (SI-8, SIM-7) cycles of in vitro selection

Nucleotide position	RNA pool	G	A	T	C	GG/CGG	CG
15 (A in tRK1)	SI-3 (21)	33% (7)	10% (2)	14% (3)	43% (9)		
	SI-8 (32)	<b>66% (21)</b>	6% (2)	6% (2)	22% (7)		
	SIM-3 (31)	48% (15)	6% (2)	3% (1)	43% (13)		
	SIM-7 (36)	28% (10)	8% (3)	8% (3)	<b>56% (20)</b>		
17 (C in tRK1)	SI-3 (21)	14% (3)	19% (4)	9.5% (2)	24% (5)	9.5% (2)	24% (5)
	SI-8 (32)	12% (4)	9% (3)	6% (2)	16% (5)	19% (6)	<b>38% (12)</b>
	SIM-3 (31)	35% (11)	13% (4)	17% (5)	35% (11)		
	SIM-7 (36)	33% (12)	31% (11)	14% (5)	22% (8)		
23 (C in tRK1)	SI-3 (21)	33% (7)	19% (4)	10% (2)	38% (8)		
	SI-8 (32)	6% (2)	<b>66% (21)</b>	19% (6)	9% (3)		
	SIM-3 (31)	26% (8)	29% (9)	13% (4)	32% (10)		
	SIM-7 (36)	17% (6)	<b>61% (22)</b>	11% (4)	11% (4)		

Numbers in parentheses correspond to the amount of plasmids sequenced. Base substitutions selected with reliability >95% (calculated with STATISTICA) are indicated in bold.

For the aptamers of the SI-8 library, *in silico* analysis revealed the same two types of secondary structures for all the selected RNAs. The first model is based on the assumption that the aminoacceptor stem of tRK1 is not disturbed. In this structure (referred to as the A-structure) (Fig. 2A), the long paired region could play the role of the D/anticodon helical domain of tRNA and in the three-dimensional model may be perpendicular to the acceptor stem. The last hairpin could play a stabilizing role. Thus, the molecule can be folded into a very close tRNA-like structure with all required distances and angles (Zagryadskaya et al. 2004).

The second model suggests the formation of an alternative helix (referred to as an F-stem) at the 3'-part of the molecule (F-structure) (Fig. 2A). The middle part of the structure (nucleotides 12–55) is just the same as in structure A, including the long (8 bp) paired region and the short “stabilizing” hairpin. Noteworthy, all the three stably selected substitutions in the D-arm of tRK1 (positions 15, 17, and 23) are involved in base-pairing, indicating their impact on the secondary structure.

For aptamers of the SIM-7 series, as for SI-8, two general types of structure can be predicted: structure A, containing the acceptor stem of tRK1, and structure F, with the alternative helix at the 3'-part of the molecule (Fig. 2B).

All the RNAs can be folded into two- or three-hairpin structures with a central loop containing a C-rich sequence that was selected for the aptamers of this series.

Comparing the RNA aptamers selected by either mitochondrial import or preMSK1p binding plus import, it can be noticed that one feature is in common for all RNAs: the possibility of F-hairpin formation. Moreover, for all the individual aptamers tested, the free energy of F-structure formation was lower than that of A-structure formation (Table 1).

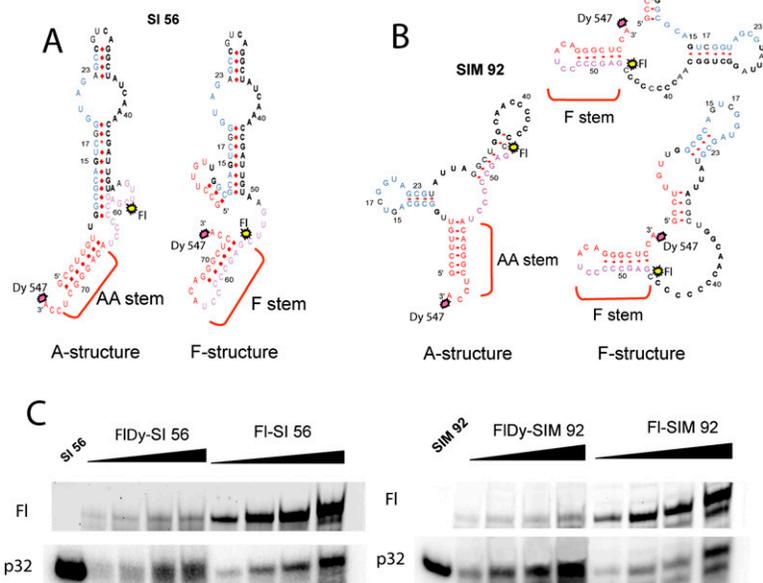
### Study of the alternative structure formation by in-gel FRET

To prove directly the possibility of F-structure formation for imported RNAs, we have used the in-gel FRET approach, allowing us to estimate distances between different points in the same RNA molecule labeled by fluorescent dyes, since the efficiency of energy transfer between a pair of fluorophores is inversely proportional to the sixth power of their distance in the range 20–80 Å (Walter 2003; Radman-Livaja et al. 2005). Two RNA aptamers issued from the SI and SIM selection procedure, SI 56 and SIM 92, have been chosen for the analysis. The donor fluorophore fluorescein (Fl) was

introduced into the positions corresponding to C56 of tRK1, conservative for all aptamers (Fig. 2; Table 1), and the acceptor fluorophore Dy547 was added at the 3'-end of the RNA molecules. The distance between these positions should be quite different for two structural models proposed for selected RNAs (Fig. 2A,B): in the structures type A, we estimate a total distance between the dye attachment sites as  $65 \pm 5$  Å, while in alternative F-structures it should be shorter up to  $25 \pm 5$  Å, resulting in more efficient quenching of the donor fluorescence in the presence of the acceptor dye.

The efficiency of donor fluorescence quenching was measured in native PAGE for SI 56 and SIM 92 RNAs containing fluorescein only or both dyes, Fl and Dy547 (Fig. 2C). The simple Förster relation (Sun et al. 2006) yields a distance of  $35.5 \pm 1$  Å for SI 56 RNA and  $35 \pm 1$  Å for SIM 92 RNA (Table 3). Using the Förster relation for a fluctuating chain (Kobitski et al. 2008), we obtained even smaller values,  $\sim 20$  Å for both RNAs, which are closer to the distance predicted for the F-structure.

These data indicate that RNA aptamers issued from the selection procedure and



**FIGURE 2.** Secondary structure predictions and in-gel FRET analysis of selected RNA aptamers. (A,B) Secondary structure prediction for RNA aptamers of (A) SI and (B) SIM series. Two types of structure are shown for each RNA, with a canonical aminoacceptor (AA) stem and with an alternative F-stem. (Red) Nucleotides corresponding to the tRK1 AA-stem; (blue) to the D-arm; (purple) to the TΨC stem-loop; (black) stably selected substitutions and variable regions; fluorophore positions are shown by slashes; (Fl) fluorescein. (C) In gel FRET analysis of two selected RNA aptamers, (left panel) SI 56 and (right panel) SIM 92. Radioactive signals, p32, and fluorescence (ex. 488 nm, em. 520 nm), Fl, of increasing amounts of RNAs labeled by donor fluorophore only (FI-RNA) or by both donor and acceptor fluorophores (FIDy-RNA), in a native 12% PAGE.

**TABLE 3.** FRET efficiencies and the calculated distances between the fluorophore dye attachment sites in the free RNAs and tRK1–protein complexes

	FRET efficiency, <i>E</i> (%)	Distance (Å)
Selected aptamer SI 56	94 ± 0.7	35.5 ± 1
Selected aptamer SIM 92	94.5 ± 0.6	35 ± 1
Free tRK1	93 ± 0.8	36 ± 1
tRK1–MSK complex	75 ± 2	46 ± 1
tRK1–Eno2 complex	98 ± 0.5	27 ± 1

An average of two to three independent experiments is presented.

characterized by high mitochondrial import efficiency, in native conditions can be, at least partially, folded into the F-structure, as it was predicted in silico.

### Structural rearrangements of imported lysine tRNA

Prediction of yeast tRNA<sup>Lys</sup> secondary structures also shows a reasonable possibility to form the F-hairpin structure for tRK1, but not for the nonimported tRK2 molecule (Fig. 3A; Table 1). These findings allow us to hypothesize that formation of the alternative structure might serve as an import determinant, which is required for interaction of the imported tRNA with protein import factors.

However, our attempts to resolve the tRK1 structure in solution by chemical and enzymatic probing were not successful due to the presence of a mixture of different conformations (data not shown). To distinguish between classical and alternative conformations of tRK1, we used the in gel FRET approach for a T7-transcript of the *tRK1* gene labeled by the donor fluorophore fluorescein in position C56 of the TΨC loop, and the acceptor fluorophore Dy547 added at the 3'-end of the tRNA molecule (Fig. 3A). In the classical tRNA L-shape structure, the distance between these positions was measured as 55–60 Å (Shi and Moore 2000), while the alternative structure formation should result in bringing the 3'-end and TΨC loop together up to 25 Å.

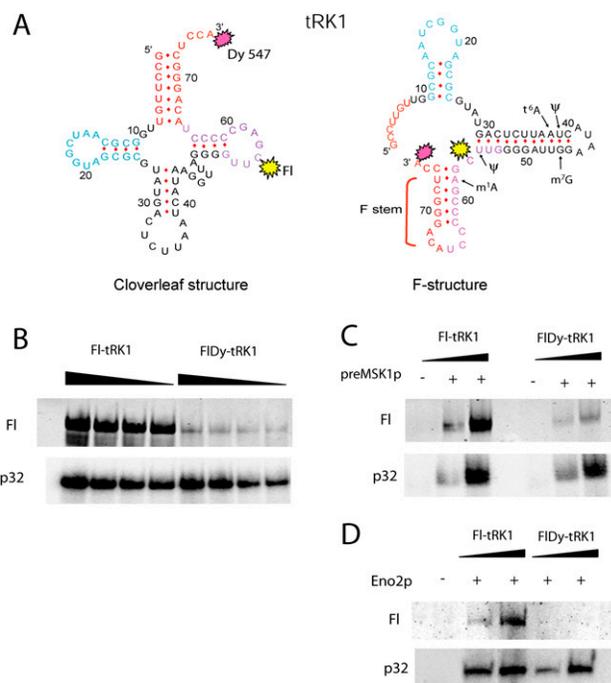
For the in vitro transcript of the *tRK1* gene containing the two fluorophores (referred to as FIDy-tRK1), the efficiency of donor fluorescence quenching yields a 36-Å distance between dyes (Fig. 3B; Table 3), which corresponds to values obtained for selected RNA aptamers and is significantly less than the distance measured for the classical tRNA structure. Such a value may support the idea that the FIDy-tRK1 transcript, lacking post-transcriptional modifications, assumes a mixture of different conformations, as it was demonstrated for human mitochondrial tRNA<sup>Lys</sup> (Kobitski et al. 2008), and can be partially folded into the F-structure.

We supposed that the interaction with proteins should fix one preferential conformation of the tRNA. Therefore, to monitor the changes in secondary structure of tRK1 during interaction with protein import factors (Eno2p and preMSK1p), we performed gel-shift assays and measured

the FRET efficiency for FIDy-tRK1 in the tRNA–protein complexes separated in native PAGE (Fig. 3C,D). It appeared that formation of these RNA/protein complexes was not prevented by the presence of the fluorophores. In the complex with enolase 2, the distance between the fluorophores in FIDy-tRK1 was estimated as 27 Å, as it was predicted for the F-hairpin structure (Table 3). We can therefore suggest that enolase binds preferentially and/or stabilizes the particular conformation of tRK1, in which the 3'-end of tRNA and the TΨC loop are close to each other.

After incubation of FIDy-tRK1 with preMSK1p, the distance between the 3'-end and the TΨC loop of FIDy-tRK1 in the resulting complex was estimated as 46 Å (Fig. 3C), demonstrating that tRK1 adopts another conformation, close to but slightly different from the classical L-form found in the complexes of tRNAs with their cognate aminoacyl-tRNA-synthetases (Cusack et al. 1996). This is consistent with our previous studies suggesting the RNA-chaperone abilities of yeast enolase (Entelis et al. 2006) and a particular way of interaction between tRK1 and preMSK1p that does not lead to tRNA aminoacylation (Tarassov et al. 1995).

To prove the impact of F-stem formation on the tRNA import ability and to study the role of other tRNA domains, we constructed and tested a set of artificial mini-RNAs.



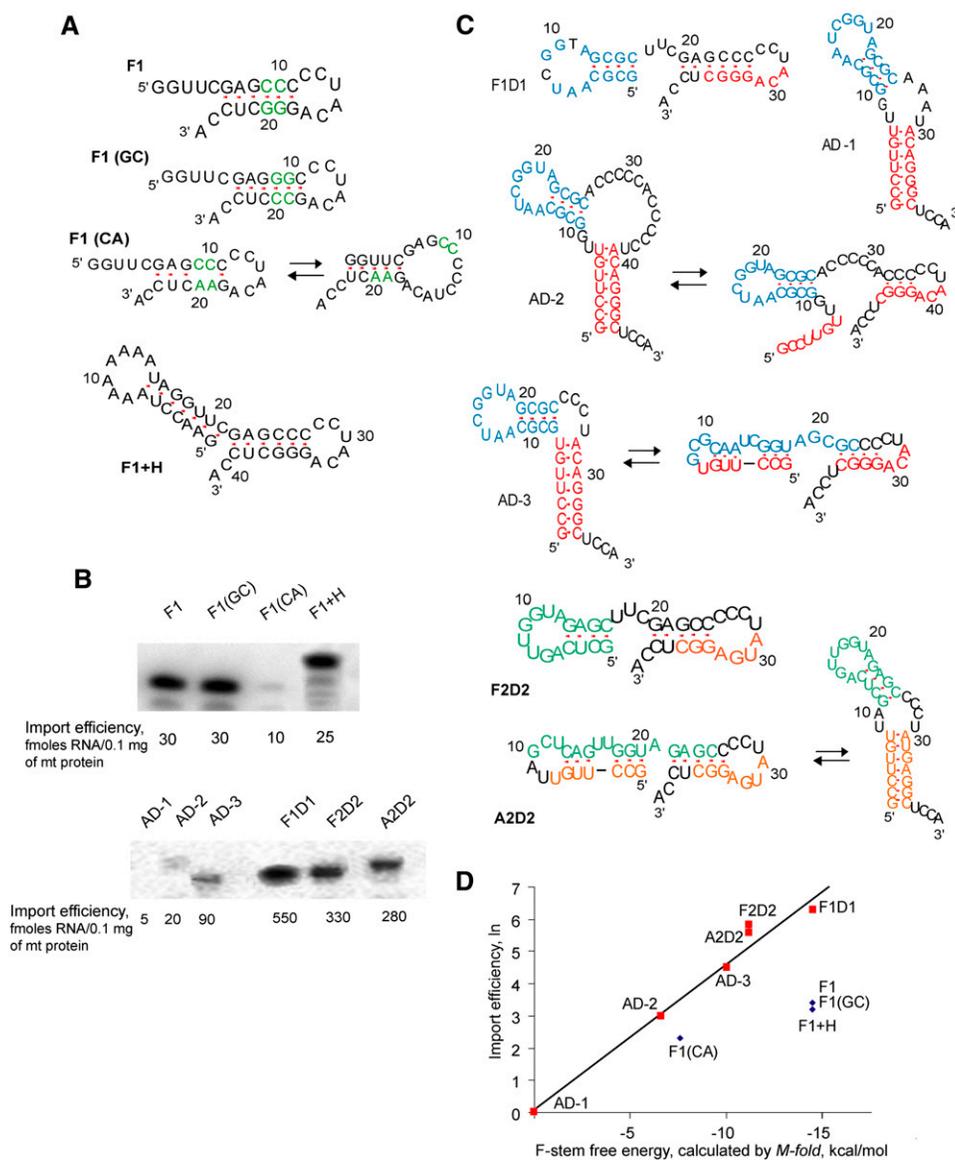
**FIGURE 3.** Study of conformational rearrangements in the tRK1 molecule by the FRET approach. (A) Secondary structures of tRK1 predicted by Mfold. tRK1 domains are colored as in Figure 2, and fluorophore positions are shown by splashes. Post-transcriptional modifications are indicated only in the tRK1 regions involved in the alternative structure. (B–D) In-gel FRET analysis of (B) tRK1, (C) tRK1 complex with preMSK1p, and (D) tRK1 complex with Eno2p. Radioactive signals (p32) and fluorescence (Fl) in native 9% PAGE are presented, as in Figure 2D.

## Mitochondrial import of small synthetic RNAs

We have previously reported that the 25-nt fragment of the 3'-part of tRK1 (referred to as F1) (Fig. 4A) was able to be transported into yeast mitochondria on its own and could be folded into a stem-loop structure, corresponding exactly to the F-stem (Entelis et al. 1998).

The set of short molecules based on the F1 sequence was designed and tested for import into isolated yeast mitochondria (Fig. 4A). Two C-G base pairs in the F1 helix structure were substituted by G-C pairs in F1(GC) or by unpaired

nucleotides C:A in F1(CA). The same values of import efficiency (Fig. 4B; Table 4) for F1 and F1(GC) indicate that stability of the stem, rather than its nucleotide sequence, has an impact on import ability of these small RNAs. The F1(CA) version where two base pairs are destroyed is still able to form a rather weak helix structure and is imported three times less efficiently than F1. This correlates with data obtained on *Leishmania* mitochondria suggesting the need of hairpin structure for the specific import of RNAs longer than 17 nt (Rubio et al. 2000). Another small RNA named F1+H, containing an additional hairpin joint to F1, has the same



**FIGURE 4.** Structure and mitochondrial import of small synthetic RNAs. (A) Short RNA molecules based on the sequence of F1 (25-nt fragment of the tRK1 3'-part). Nucleotide substitutions are colored. (B) Examples of in vitro import test for the labeled short RNAs and its import efficiencies; see also Table 4. (C) Structure of synthetic RNA molecules composed of joined F-helix, D-arm, and/or aminoacceptor (AA-) stem of tRK1/tRK2. For several versions two alternative structures are shown. AA-stem regions are shown in red for tRK1 and in orange for tRK2; D-arms are in blue for tRK1 and in green for tRK2. (D) Dependence of synthetic RNA import efficiencies on the F-stem free energy (Mfold predicted).

**TABLE 4.** Mitochondrial import properties of small synthetic RNAs

RNA	Import into yeast mitochondria (fmol of RNA/0.1 mg of mt protein)	Import into human mitochondria (fmol RNA/0.1 mg of mt protein)	Mfold predicted free energy of the F-stem (kcal/mol)
tRK1	50 ± 5	120 ± 10	—
F1	30 ± 5	ND	-14.5
F1(GC)	30 ± 5	ND	-14.5
F1(CA)	10 ± 5	ND	-7.6
F1+H	25 ± 5	ND	-14.5
F1D1	550 ± 15	750 ± 15	-14.5
AD-1	5 ± 5	5 ± 5	0
AD-2	20 ± 5	ND	-6.6
AD-3	90 ± 5	50 ± 5	-9.9
A2D2	280 ± 10	300 ± 10	-11.2
F2D2	330 ± 10	350 ± 10	-11.2

ND, Not determined.

import efficiency as F1 (Fig. 4A,B). These results demonstrate the importance of the F-hairpin structure for small synthetic RNA import into isolated mitochondria. However, their import efficiencies less than tRK1 suggest implications of specific nucleotides, sequences, or structural motifs of other tRK1 domains in the import process.

To test the impact of different domains, another set of artificial RNA molecules composed of joint F-helix, D-arm, and/or aminoacceptor (AA-) stem of tRK1 or tRK2 was designed (Fig. 4C). Surprisingly, the RNA hairpin structure corresponding to the D-arm of tRK1 joined to the F-helix (named F1D1) led to a 10-fold increase of import abilities of the resulting RNA compared to F1 (Fig. 4B; Table 4). To verify the role of the D-arm in the import, we have constructed small RNAs containing the AA-stem and D-arm of tRK1 (referred to as AD-1, 2, and 3), differing by the length of the connector region between the two domains (Fig. 4C). Synthetic RNA AD-1 with a classical 2-nt connector region was not able to penetrate into yeast mitochondria, suggesting that the AA-stem joined to the D-arm of tRK1 cannot be imported on its own and does not contain a sufficient set of import determinants. On the contrary, versions AD-2, differing from AD-1 by the long C-rich loop region (as found in aptamers of SIM series), and AD-3 (without any connector) were imported into yeast mitochondria with increased efficiencies. Their import levels did not correlate with the stabilities of AA and D-stem-loop structures, but could be explained from the point of view of alternative structure formation. Indeed, the sequence of the AD-1 RNA completely excludes the possibility of 3' hairpin structure formation. However, for the versions AD-2 and AD-3, it is possible to predict the F-stem structures with increasing stability (3 base pairs [bp] and 4 bp, correspondingly) (Fig. 4C). A diagram representation of these data (Fig. 4D) shows a clear correlation between the small RNAs' import efficien-

cies and their F-stems' stability for F1D1, AD-1, AD-2, and AD-3, indicating the impact of F-stem formation on the importability of small synthetic RNAs.

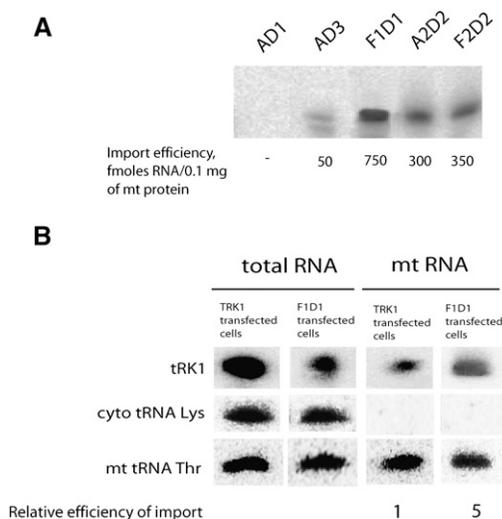
This suggestion was supported by analysis of artificial RNAs A2D2 and F2D2, containing the D-arm of nonimported tRK2 and the AA-stem (or its 3'-part for F2D2) corresponding to mutant tRK2 version G1-C72; U73, which had been previously characterized by very efficient mitochondrial import (Entelis et al. 1998; Kazakova et al. 1999). Both short RNAs could be folded into 5-bp F-stem containing structures that correlated with a rather high level of mitochondrial import (Fig. 4B; Table 4). It was observed that F2D2 RNA was imported two times less efficiently than F1D1 RNA, the latter being character-

ized by a more stable F-stem structure (Fig. 4C,D). Therefore, the results of the short RNA import analysis support the idea that the possibility of alternative F-hairpin formation at the 3'-end of tRNA is one of the mitochondrial import determinants.

Among all the short RNAs tested, those containing the D-arm structure joined to the F-hairpin were characterized by very high import capacities (versions F1D1 and F2D2). However, version F1+H, with a loop of seven adenosines joined to hairpin F, had lower import ability than versions with a D-loop sequence (Fig. 4D). This might indicate that the D-loop sequence, conserved in most of the selected RNA aptamers, also serves as an "import-positive" feature, providing a platform for one of the protein import factors.

We have also tested the possibility for short artificial RNAs to be internalized by isolated human mitochondria in the presence of human proteins. We have shown that RNAs that were well imported into yeast mitochondria (F1D1, F2D2, and A2D2) were also imported into isolated HepG2 mitochondria with high efficiencies (Fig. 5A; Table 4).

F1D1 RNA characterized by the best import ability was then chosen to test the possibility of its mitochondrial import in vivo in cultured human cells. For this purpose, we have used the previously described approach of direct transfection of mammalian cells by purified tRNAs (Kohrer et al. 2001). We found that F1D1 RNA was stable in HepG2 cells at least 48 h after transfection, and was detected in the mitochondrial fraction after RNase and digitonin treatment, indicating its at least partial localization in the mitochondrial matrix (Fig. 5B). Efficiency of F1D1 RNA import into human mitochondria in vivo was five times higher than that of the tRK1 T7 transcript. These findings open the possibility of exploiting mitochondrial import of small artificial RNAs for biomedical applications.



**FIGURE 5.** Import of small synthetic RNAs into human mitochondria. (A) Example of  $^{32}\text{P}$ -labeled RNAs import into isolated HepG2 mitochondria in the presence of human import-directing proteins. The mitochondrial import efficiencies were calculated as the average of three independent experiments; standard deviation values are indicated in Table 4. (B) Northern blot analysis of presence of tRK1 (T7 transcript) and synthetic RNA F1D1 in total and mitochondrial RNA preparations 48 h after transient transfection of HepG2 cells. Probes used for hybridization are indicated in the *left* column. Import efficiency of RNAs was estimated as a ratio between the signal obtained after hybridization with the anti-tRK1 probe and that obtained after hybridization with an oligonucleotide against the mitochondrial tRNA<sup>Thr</sup> in the mitochondrial RNA preparation. In order to compare import efficiencies of different RNAs, the values obtained were divided by the ratios calculated in the same way but in a total RNA preparation, which indicate the total level of each RNA in the transfected cells. The resulting normalized import efficiency of the tRK1 transcript was taken as 1.

## DISCUSSION

### In organello selection of importable RNA aptamers

In the field of RNA import, one of the major challenges is to determine what controls the specificity of import. However, tRNA import signals are now known to be as diverse as the number of organisms studied (Salinas et al. 2008). In the protozoan *Tetrahymena pyriformis*, the UUG anticodon of the imported tRNA<sup>Gln</sup> is essential and sufficient for mitochondrial targeting (Rusconi and Cech 1996). In *Trypanosoma brucei*, the T-stem nucleotides determine the localization of the tRNA<sup>Met</sup> (Bouzaidi-Tiali et al. 2007). Several studies suggested that tRNA import can be defined by the tertiary structure of the molecule. Thus, for mitochondria of *Leishmania tarentolae*, the nonspecific import of mini-helices smaller than 17 bases and a structural requirement for longer RNAs was demonstrated; however, the signals for importation of folded RNAs have not been determined (Rubio et al. 2000). In *Leishmania tropica* tRNAs, two import signals were identified: in the variable loop-T region and in the D-arm, the latter consisted of the secondary structure motif and A23

nucleotide identity (Bhattacharyya et al. 2002; Goswami et al. 2003). In higher plants, mutations abolishing tRNA mitochondrial import have been described in anticodon and D- and T-domains of different tRNAs (Duchene et al. 2009), raising the possibility that the 3D structure of tRNA, determined by interaction between D- and T-loops, is essential for import (Salinas et al. 2005).

The aim of this work was to identify the mitochondrial import determinants in the yeast tRNA<sup>Lys</sup> molecule by the SELEX approach. This technique permits isolation of molecules with a high affinity to a target from a pool of heterologous RNAs by cycles of partitioning and amplification of selected sequences. SELEX has been successfully used to isolate RNA molecules that bind a particular protein from a pool of randomized sequences (Peterson et al. 1993, 1994). Applied to mitochondrial import of RNA, this method has been used to search for import signals in RNAs recognized by *L. tropica* mitochondrial receptors (Bhattacharyya et al. 2002). In this protozoan, the whole set of mitochondrial tRNAs is imported from the cytosol by a mechanism that is different from the one found in yeast (Mukherjee et al. 2007). A pool of random 16-mer sequences flanked by anchors has been subjected to selection for import into isolated *L. tropica* mitochondria, and thus permitted identifying a set of short “import signals” corresponding to the fragments of different tRNA domains (Bhattacharyya et al. 2002, 2003).

In the yeast *S. cerevisiae*, one of the two isoacceptor lysine tRNAs, tRK1, is imported into mitochondria. So we started our SELEX experiment from an initial library of tRK1-derived molecules containing 14 random nucleotides in positions that differ between imported tRK1 and nonimported tRK2 (Fig. 1A; Table 1). After seven to eight cycles of selection for import into isolated yeast mitochondria followed by RT-PCR amplification, we obtained RNA pools demonstrating a 25–30-fold increase of import efficiency (Fig. 1E). This corresponds to the enhancement obtained for the RNA import into *Leishmania* mitochondria (Bhattacharyya et al. 2002) and indicates the successful enrichment of a randomized RNA pool with sequences capable of being imported into mitochondria.

However, analysis of individual selected RNAs revealed that we had not obtained the full-size tRNA molecules with changes in randomized positions, as it was expected, but a set of RNA-aptamers of different lengths, containing large deletions and rearrangements. This can be due to amplification artifacts as so-called “the tyranny of short motifs,” since in SELEX experiments the shorter, less complex binding motifs may predominate (Conrad et al. 1995; Piasecki et al. 2009). In any case, all the individual RNA aptamers obtained and tested in this work demonstrated high levels of in vitro import (Table 1), indicating the successful selection of mitochondrial import determinants. This may reflect the flexibility of the mitochondrial import pathway and the possibility for different types of RNAs to bind the protein import

factors and membrane receptors to be thereafter transported into the mitochondrial matrix, at least *in vitro*.

### Structural rearrangements of tRK1

Analysis of the importable RNAs obtained in selection experiments allows us to suggest that at least one of the modes of interaction leading to RNA mitochondrial import could be realized through the alternative F-structure formation, different from a classical L-form tRNA model. This is the first evidence for implication of RNA secondary structure rearrangement in the mechanism of mitochondrial import selectivity, since all the previous studies suggested the role of the classical tRNA tertiary structure (Goswami et al. 2003; Salinas et al. 2005).

To prove the real existence of such conformational rearrangement, we used the FRET approach, a powerful technique allowing us to estimate distances between different points in the same RNA molecule labeled by fluorescent dyes (Walter 2003). The *in-gel* FRET method (Radman-Livaja et al. 2005) enabled us to measure the distance between the 3'-end and the T-loop of tRK1 in the complexes with its mitochondrial import factors, preMSK1p and Eno2p. We show that in the complex with targeting protein factor Eno2p, tRK1 adopts a particular conformation characterized by bringing closer nucleotides C56 and A75, as it was predicted for the F-hairpin structure (Fig. 3).

Our *in silico* structural predictions and the FRET approach have been performed with a synthetic transcript. Do *in vivo* post-transcriptional modifications of tRK1 allow the alternative structure formation? The tRK1 molecule contains modified nucleosides in 11 positions (compared to 16 in nonimported tRK2) (see Fig. 1A; Juhling et al. 2009), and only five of them are localized in the hairpin regions of the proposed alternative F-structure (Fig. 3A). A long hairpin, including the tRK1 V-loop and anticodon arm nucleotides, should not be destabilized by post-transcriptional modifications, since t<sup>6</sup>A in position 37, as well as m<sup>7</sup>G46, leave the hydrogen-bond capacity pattern unchanged, and pseudouridines  $\Psi$ 39 and  $\Psi$ 55 should have a stabilizing effect on base-pairing (Helm 2006). The m<sup>1</sup>A58 modification, which could disturb base-pairing A58-U73 in F-helix, was found only in a fraction of tRK1 molecules (Smith et al. 1971). Thus, no modifications able to prevent the alternative helices formation can be detected in the tRK1 structure. However, the post-transcriptional modifications in tRNAs have been considered to stabilize classical tRNA 3D folding, avoiding the alternative structures (for review, see Helm 2006). We can therefore suggest that nucleotide modifications in tRK1 restrict its possibility of folding into an F-structure, allowing mitochondrial import of 1%–5% of the tRK1 cytosolic pool, which is able to adopt this structure with the help of the RNA-chaperone protein factor enolase. This correlates with the observation that tRK1 *in vitro* transcript, being a

poor substrate for aminoacylation, however, can be better imported into yeast mitochondria than modified tRK1 (Kolesnikova et al. 2002).

The idea of alternative tRNA folding first appeared in very early studies demonstrating tRNA misfolding into a conformation inactive for aminoacylation by a transition from a cloverleaf secondary structure to an extended one (Madore et al. 1999). Recently, by a single-molecule FRET technique, it was shown that a transcript of human mitochondrial tRNA<sup>Lys</sup> in solution assumed a mixture of three conformations (unfolded, extended hairpin, and cloverleaf-based L-shape), depending on magnesium ion concentration and A9 base modification (Kobitski et al. 2008). Another type of alternative tRNA conformation, the “ $\lambda$ -form,” was found in complex with one of the modification enzymes, ArcTGT. This enzyme modifies its buried target site (G15) by recognition of a tRNA marked by a profound conformational change making the D-stem and the canonical core of the L-form structure completely disrupted (Ishitani et al. 2003).

All alternative tRNA conformations reported before suggested the intactness of the AA-stem. Here we hypothesize that to escape the cytosolic protein synthesis cycle and to enter inside the mitochondria, the tRNA molecule might adopt a completely different conformation, including the reorganization of the aminoacceptor, T-arm, and anticodon arm, retaining only the D-arm intact. This unusual folding can be induced or favored by interaction of aminoacylated tRK1 with RNA-chaperone enolase 2.

In our previous work (Entelis et al. 2006), yeast enolase was shown to have a capacity to reduce the  $K_d$  of the tRK1–preMSK1p complex. In the presence of both proteins, no ternary complex was observed, and only tRK1–preMSK1p was detectable. Such a pattern is characteristic of consecutive reactions, indicating that Eno2p binds tRNA and then transfers it to the second protein, preMSK1p. Thus it was suggested that Eno2p could induce some conformational changes in tRNA. Data obtained in the present work confirm this hypothesis, since we demonstrate that in the complex with enolase, tRK1 adopts a particular conformation, in which the 3'-end of tRNA and the T $\Psi$ C loop are close to each other.

We suggest that the housekeeping protein enolase is implicated not only in glycolysis and the targeting of imported tRNA toward the mitochondria, as it was shown previously, but also in the discrimination between cytosolic tRNAs partially imported into mitochondria, and non-imported ones. Enolase might induce the temporary conformational changes in the aminoacceptor stem of all the tRNA molecules; thereafter only those RNAs that are able to form a stable alternative F-stem proceed to the mitochondrial import pathway, including specific interactions with the carrier protein, preMSK1p, and membrane receptors. In the complex with preMSK1p, tRK1 adopts an unknown “intermediate” conformation, which should

facilitate its re-folding into the classic cloverleaf-based L-shape structure needed for participation in mitochondrial translation.

### Impact of “import determinants” on the selectivity of mitochondrial targeting

From the point of view of conformational rearrangement as an import selectivity determinant, some of our previous results should be re-discussed. Two yeast isoacceptor lysine tRNAs, imported tRK1 and nonimported tRK2, differ in several positions of the aminoacceptor stem (Fig. 1A; Table 1). Various versions of the *tRK2* gene with replacements in positions 1:72 and 73 have been expressed in yeast cells, and mutant tRNAs' mitochondrial import efficiencies were measured (Kazakova et al. 1999). It has been shown that introduction of a G1:C72 pair in the tRK2 context led to import of the mutant tRNA, whereas an additional mutation in the discriminator position 73 increased the import efficiency, which became almost the same as for tRK1 (Table 5). Therefore, bases G1:C72 and U73 at the end of the AA-stem were suggested to act as an import signature in the tRK2 context. So far, the role of these nucleotides, especially the one in the “discriminator” position 73, has not been clear. To explain these data, here we compared the mutant versions' sequences from the point of view of the possibility to form an alternative helix structure at the 3'-end of the RNA molecules. One can see a clear correlation between mitochondrial import efficiency and the stability of the predicted F-stem at the 3'-end of these tRNAs (Table 5). In fact, the 3'-part of the nonimported tRK2 molecule cannot adopt any stable structure. Correspondingly, a 20-base fragment of its mutant version with an exchange of A72 for C72 (as in tRK1) can be folded into a rather stable alternative conformation and can be imported, whereas the exchange of two nucleotides, A72G73 for C72U73, stabilizes the F-hairpin, thus increasing the importability of tRNA. This can indicate the role of conformational changes, notably the F-helix formation, in tRNA mitochondrial import, not only in vitro, but also in living yeast cells.

In yeast tRNAs<sup>Lys</sup>, not only the aminoacceptor stem nucleotides, but also the wobble position C34 of the anticodon, have an impact on mitochondrial import (Kazakova et al. 1999; Kolesnikova et al. 2002). In the tRK1 alternative F-structure model, the anticodon nucleotides are involved in the long hairpin structure (Fig. 3A). Apparently, this hairpin can determine the overall structure stability. Therefore, C34-to-U34 substitution (as in tRK2) should lead to a destabilization of the long hairpin structure due to the three consecutive G:U pairs' formation. In native tRNAs, U34 is always modified, thus introducing steric conflicts and making the alternative F-structure formation less probable. We can therefore suggest that the anticodon domain of tRNA plays an auxiliary role in the mechanism of mitochondrial targeting selectivity, working mostly as a negative factor to prevent the conformational changes in nonimportable tRNAs and therefore guaranteeing the specificity of tRNA-protein interactions. Moreover, if the anticodon loop sequence could harm the conformational rearrangement needed for targeting, its deletion from the tRNA structure may even improve the mitochondrial import, as we can see for the RNA aptamers obtained in SELEX experiments (Table 1). Notably, the structure of small artificial RNA F1D1, demonstrating the best importability, is very close to the tRK1 alternative F-structure with the long hairpin region deleted (Figs. 3A, 4C). Therefore, the hypothesis of alternative tRNA conformation as one of the import determinants allows us to explain not only the results obtained in vitro with RNA aptamers, but also to understand the implication of previously identified “import determinants” in the mechanism of mitochondrial targeting selectivity.

### Mitochondrial import of RNAs as a therapeutic strategy

The results presented here have another promising issue: some short synthetic RNAs were characterized by an extremely high efficiency of import into yeast as well as into human mitochondria. This supports our hypothesis that human cells possess a cryptic tRNA import mechanism that can be activated in the presence of importable RNAs and, in the case of specific need (either metabolic or genetic), provides the cell with an additional adaptive mechanism (Kolesnikova et al. 2004).

The use of the RNA mitochondrial import pathway can open a new door to treat severe pathological diseases associated with mtDNA mutations (Taylor and Turnbull 2005). One possible strategy consists of supplementation of defective mtDNA-encoded tRNAs with engineered tRNA alternatives expressed in the nucleus and imported into mitochondria. Two successful attempts to

**TABLE 5.** Possibility of the alternative F-stem formation for 20-nt fragments at the 3'-end of the mutant tRK1/tRK2 versions

RNA	Sequence of 20 bases at 3'-end of tRNA molecule <sup>a</sup>	Mitochondrial import efficiency, % of tRK1 <sup>a</sup>	Mfold predicted dG of F-stem formation, kcal/mol
tRK2	gagccccua <b>uga</b> gg <b>ag</b> cca FF-FF FF-FF	<1	1.3
tRK2 U1G:A72C	gagccccua <b>uga</b> gg <b>C</b> cca F-FFF-F F-FFF-F	55-60	-8.2
tRK2 U1G:A72C;G73U	gagccccua <b>uga</b> gg <b>CU</b> cca FFFFF FFFFF	90-110	-10.3
tRK1	gagccccua <b>CAG</b> gg <b>CU</b> cca FFFFF FFFFF	100	-13.2

<sup>a</sup>As published previously (Kazakova et al. 1999). Bases differing between tRK1 and tRK2 are shown in bold; (F) nucleotides involved in the F-helix formation.

cure mitochondrial deficiency associated with the syndrome MERRF were already reported: we have used a cryptic tRNA import mechanism to target in the human mitochondria recombinant yeast tRNAs<sup>Lys</sup> (Kolesnikova et al. 2004). Mahata et al. (2006) have introduced the tRNA import apparatus from *Leishmania* into human cells to target a set of cytoplasmic tRNAs in the mitochondria. Other approaches based on the allotopic rescue of deleterious mtDNA mutations may be developed, as import of tRNAs with altered aminoacylation identities and suppressor tRNAs correcting mutations in protein-coding genes (Tarassov et al. 2007). Results obtained in the present study may be helpful for engineering of new importable tRNA molecules possessing the alternative folding abilities.

In the majority of patients, both mutant and wild-type mtDNA molecules are present in the same cell, a phenomenon known as “heteroplasmy.” Antigenomic rescue of deleterious mtDNA mutations was proposed (but not yet realized), consisting in selective inhibition of the mutant mtDNA replication, thereby allowing propagation of only wild-type molecules (Taylor et al. 1997). The importable synthetic RNAs obtained in the present study cannot be expressed in vivo from the internal RNA polymerase III promoter. However, one of these RNAs introduced into human cells by a transient transfection procedure was shown to be stable in the cytoplasm and imported into the mitochondrial matrix with an efficiency five times higher than that of tRK1. Remembering that even low levels of transgenic tRNA expression permitted the correction of pathogenic effects due to mutation in human mitochondrial tRNA (Kolesnikova et al. 2004), this observation opens the possibility of creating a new mitochondrial vector system based on small RNA molecules, able to target therapeutic anti-replicative oligonucleotides into deficient human mitochondria.

## MATERIALS AND METHODS

### Randomized RNA library design

The initial pool of RNAs was generated by T7 transcription on a PCR amplificate of a 73-mer oligonucleotide O1 containing random nucleotides in 14 positions (Fig. 1A). PCR amplification was done using the oligonucleotides O2, containing the BstNI site to recreate the 3'-terminal CCA sequence, and O3, containing the T7 RNA polymerase promoter for in vitro transcription (Table 6).

In vitro transcripts were gel-purified using a 12-cm-long, 10% polyacrylamide gel containing 8 M urea. In these conditions, tRNA

**TABLE 6.** Sequences of oligonucleotides

<b>O1</b> (template for randomized RNA library creation)	gccttggtggcgcaNtNggtagNgcgtNngNctNNNaaNcNnaaNgtNaggggttcagagcccc tacagggtcca
<b>O2</b> (primer with T7-promotor sequence)	cccaagcttaatacagactcactatagccttggcgc
<b>O3</b> (primer for RT)	gggatcctggagccctgtagg
	<b>Templates for small RNAs transcription (transcribed part is underlined):</b>
<b>F1</b>	TGATCATAATACGACTCACTATAGGTCGAGCCCCCTACAGgCCTCCAGGTGATCAT
<b>F1 (GC)</b>	TGATCATAATACGACTCACTATAGGTCGAGGGCCCTACAGccCCTCCAGGTGATCAT
<b>F1 (CA)</b>	TGATCATAATACGACTCACTATAGGTCGAGccCCTACAGaaCCTCCAGGTGATCAT
<b>F1+H</b>	TGATCATAATACGACTCACTATAGAACCTAAAAAATAGGTCGAGCCCCCTACAGGGCTCCAG GTGATCAT
<b>AD-1</b>	taatacagactcactatagccttggcgcgaatcggtagcgcgaatacagggctccagggtgatca
<b>AD-2</b>	taatacagactcactatagccttggcgcgaatcggtagcgcacccccaccctccacagggctcc agggtgatca
<b>AD-3</b>	taatacagactcactatagccttggcgcgaatcggtagcgcctccacagggctccagggtgatca
<b>A2D2</b>	taatacagactcactatagccttggcgcgaatcggtagcgcctccacagggctccagggtgatca
<b>F1D1</b>	taatacagactcactatagcgcgaatcggtagcgcctccagccccctacagggctccagggtgatca
<b>F2D2</b>	taatacagactcactatagcctcagttggtagagcctccagccccctatgaggctccagggtgatca
	<b>Probes for Northern hybridization:</b>
<b>tRK1</b>	tggagccctgtagggg
<b>cytosolic tRNA<sup>Lys</sup><sub>CUU</sub></b>	ACTTGAACCCCTGGACC
<b>mitochondrial tRNA<sup>Lys</sup><sub>Thr</sub></b>	TCTCCGGTTTACAAGAC
	<b>RNA oligonucleotides labeled by fluorophores, Fl - fluorescein</b>
<b>for Fl-RNA</b>	GGUUC(F)GAGCCCCUACAGGGCUCCA
<b>for FIDy-RNA</b>	GGUUC(F)GAGCCCCUACAGGGCUCCA(Dy547)

molecules are not completely denaturated, and their mobility depends on the stability of the secondary structure. Two yeast lysine tRNAs, imported tRK1 and nonimported tRK2, being of the same length, were characterized by different mobility in this PAGE system (Entelis et al. 1998). Taking into account that RNA molecules of our randomized library could share the structural peculiarities of both tRK1 and tRK2 molecules, RNAs were eluted from a rather large spot of the gel, comprising the area of both lysine tRNAs.

Eluted RNAs were refolded by one cycle of heat denaturation-renaturation in presence of 0.5 mM MgCl<sub>2</sub> and subjected either to binding to immobilized preMSK1p prior to import into isolated yeast mitochondria, or directly to import. After RNase treatment and swelling of mitochondria, RNA was isolated, RT-PCR amplified with O2 and O3 oligonucleotide primers, and used for the further rounds of selection or cloned into the pUC118 vector and sequenced. cDNA obtained after each round of selection was T7-transcribed and re-assayed for preMSK1p binding and in vitro import.

### In vitro import

Yeast *S. cerevisiae* strain YPH500 was used for isolation of yeast mitochondria; human mitochondria and import directing proteins (IDPs) were isolated from the HepG2 cell line as described elsewhere (Entelis et al. 2002). Yeast IDPs were isolated from a pre-protein import-deficient strain, ΔTOM20<sub>IRV</sub>, carrying plasmid pG11T6 with the *MSK1* gene to overexpress the precursor form of MSK1p (Kazakova et al. 1999).

The assay of <sup>32</sup>P-labeled RNA import into isolated yeast or human mitochondria was performed in the presence of yeast or human IDP as described (Entelis et al. 2002). A 15-min incubation of

mitochondria with a labeled RNA has been followed by a mitochondria re-purification step, RNase treatment to eliminate all the external RNA, disruption of the outer mitochondrial membrane by osmotic shock (swelling), re-purification of mitoplasts, and RNA isolation. Imported RNAs were analyzed by PAGE in a 12% polyacrylamide gel containing 8 M urea, and quantification of results was done by Typhoon-Trio scanner using ImageQuant-Tools software (GE Healthcare). To estimate the import efficiency, 50 fmol of corresponding  $^{32}\text{P}$ -labeled RNA were loaded on the same gel. All the manipulations with mitochondria, up to the RNA isolation step, normally take at least 1 h, so the amount of imported RNA detected by gel scanning should correspond to the labeled RNA that has penetrated into the mitochondrial matrix and did not degrade there in 1 h.

For in organello selection experiments, the same protocol has been used; the only difference was that isolated yeast mitochondria were incubated with an unlabeled mixture of RNA molecules (100 pmol per 50  $\mu\text{g}$  of mitochondrial protein) in a final volume of 100  $\mu\text{L}$ . For the sixth, seventh, and eighth rounds of selection, the volume of reaction was increased to 500  $\mu\text{L}$ , to decrease the concentration of RNA-binding ligands and mitochondrial receptors and, therefore, to increase the selection stringency.

### RNA synthesis and manipulation

Small artificial RNAs were obtained by PCR amplification of corresponding sequences (the oligonucleotides are listed in Table 6) followed by cloning, sequencing, and transcription. RNA transcripts obtained in vitro using T7 RNA polymerase (Promega) were gel-purified and refolded by one cycle of heat denaturation–renaturation in the presence of 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ . Aminoacylation was done with the recombinant yeast cytoplasmic lysyl-tRNA synthetase (KRS1p) as described (Entelis et al. 1998). For RT-PCR, AMV reverse transcriptase (Promega) was used. For each RT-PCR, a control reaction without reverse transcriptase was performed.

### preMSK1p binding

PreMSK1p-binding efficiency was quantified by immunoprecipitation of 5'- $^{32}\text{P}$ -labeled individual tRNA/preMSK1p complexes with anti-MSK antibodies as described (Entelis et al. 1998). For selection experiments, 100 pmol of RNA were incubated with Sepharose CL4B-BrCN-immobilized recombinant preMSK1p (10 pmol per assay) in 20 mM HEPES-KOH (pH 6.8), 20 mM KCl, 2.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM ATP, and 5 mM dithiothreitol. After the fifth round of selection, the amount of immobilized pre-MSK was decreased to 0.1 pmol. After 30 min of incubation at 20°C, Sepharose beads were washed twice with the same buffer, and RNA was eluted with 7 M urea, phenol-extracted, and precipitated by ethanol.

### RNA import in vivo

For transfection of HepG2 cells, 6  $\mu\text{g}$  of RNA per 60  $\text{cm}^2$  of confluent cells were used. Transfection was carried out by using the Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocol. Two days after transfection, mitochondria were isolated and purified as described (Entelis et al. 2001), and total and mitochondrial tRNAs were resolved in denaturing gels and analyzed by Northern hybridization with 5'- $^{32}\text{P}$ -labeled

oligonucleotide probes against the 3'-part of yeast tRNA<sup>Lys</sup><sub>CUU</sub> (for tRK1 and small synthetic RNAs detection), human cytosolic tRNA<sup>Lys</sup> (to check possible cytosolic contamination in mtRNA preparation), and human mitochondrial tRNA<sup>Thr</sup> (Table 6). The import efficiency of RNAs was then estimated after quantification in a Typhoon-Trio scanner as a ratio between the signal obtained after hybridization with an anti-tRK1 probe and that obtained after hybridization with an oligonucleotide against the mitochondrial tRNA<sup>Thr</sup> in the mitochondrial RNA preparation, as described previously (Smirnov et al. 2008). In order to compare import efficiencies of different RNAs, the total level of each RNA in transfected cells should be taken into account and normalized. For this, the import efficiencies were divided by the ratios calculated in the same way but in a total RNA preparation, which indicates the total level of RNA. The resulting normalized import efficiency of tRK1 transcript was taken as 1.

### In silico RNA analysis

To predict 2D RNA structures and estimate the free energy ( $dG$ ), the Mfold program was mainly used, but the alternative programs contrafold, pfold, and the ViennaRNA package were also used with similar results. The Malign package was used to align primary structures of RNAs, and the Statistica package to evaluate SELEX results.

### In gel FRET analysis

Fluorescent RNAs were constructed by the splint-ligation method (Kurschat et al. 2005). T7 transcripts corresponding to 1–51 nt of tRK1 and a selected aptamer SI 56, or to 1–45 nt of a selected aptamer SIM 92 (Table 1), were ligated to the chemically synthesized RNA fragments corresponding to the 3'-part of the tRK1 molecule (52–76 nt). Fluorescent groups were introduced into the RNA fragments (Thermo Scientific, Dharmacon): fluorescein (donor) in the C56 position, for Fl-RNAs; fluorescein in C56 and Dy 547 (acceptor) added to the 3'-end (A76), for double-labeled FIDy-RNAs (Table 6). After ligation, full-size RNAs were gel-purified, 5'- $^{32}\text{P}$ -labeled, and re-purified on a 12% urea-PAGE. Gel-shift assays with recombinant proteins were performed as described previously (Entelis et al. 2006). To obtain a stable tRK1–enolase complex, the recombinant yeast Eno2p with an H373F mutation (Entelis et al. 2006) was used. Dy547-labeled tRK1 was not able to form a complex with KRS1p.

Fluorescein (excitation 488 nm, emission 520 nm) signals were measured in gel with the use of a Typhoon-Trio scanner; radioactive signals were measured in the same gels using a BAS-MS Imaging Plate (Fujifilm) at the same scanner and quantified with ImageQuantTools software. The efficiency of energy transfer ( $E$ ) was calculated as the extent of donor fluorescence quenching in double-labeled (by donor and acceptor) tRK1, with the use of the standard equation:

$$\frac{I_{\text{da}}[\text{d}]}{[\text{da}]} = I_{\text{d}}(1 - E),$$

where  $I_{\text{da}}$  and  $I_{\text{d}}$  are fluorescein fluorescence intensities of RNA containing the both donor and acceptor, and with donor alone, respectively;  $[\text{da}]$  and  $[\text{d}]$  are radioactive signals of RNA with both

donor and acceptor, and with donor alone, respectively. The distance between fluorophores ( $R$ ) was calculated from the equation:

$$R = R_0 \left( \frac{1}{E} - 1 \right)^{1/6},$$

where  $R_0$  is the Förster critical distance, for the pair fluorescein/Dy547,  $R_0 = 56 \text{ \AA}$  (Sun et al. 2006). Estimation of distances between the dye attachment sites for the different RNA conformers was done as described (Kobitski et al. 2008), and calculations based on the Förster relation for a fluctuating chain are as in Kobitski et al. (2007).

## ACKNOWLEDGMENTS

We thank Alexandre Smirnov for help in RNA 2D structure prediction and critical reading of the manuscript and Aline Keilbach for administrative help. This work was supported by the Centre National de Recherche Scientifique (CNRS), Université de Strasbourg (UdS), Association Française contre les Myopathies (AFM), Agence Nationale de la Recherche (ANR), Fondation pour la Recherche Médicale (FRM), Russian Foundation for Basic Research (RFBR), and ARCUS cooperation program Alsace-Russia-Ukraine.

Received September 5, 2009; accepted February 1, 2010.

## REFERENCES

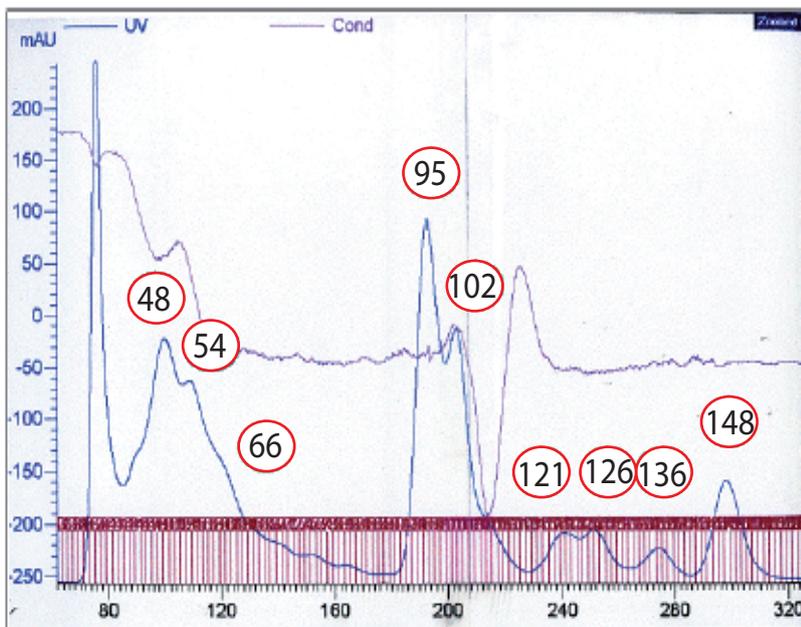
- Bhattacharyya SN, Chatterjee S, Adhya S. 2002. Mitochondrial RNA import in *Leishmania tropica*: Aptamers homologous to multiple tRNA domains that interact cooperatively or antagonistically at the inner membrane. *Mol Cell Biol* **22**: 4372–4382.
- Bhattacharyya SN, Chatterjee S, Goswami S, Tripathi G, Dey SN, Adhya S. 2003. ‘Ping-pong’ interactions between mitochondrial tRNA import receptors within a multiprotein complex. *Mol Cell Biol* **23**: 5217–5224.
- Bouzaidi-Tiali N, Aeby E, Charriere F, Pusnik M, Schneider A. 2007. Elongation factor 1a mediates the specificity of mitochondrial tRNA import in *T. brucei*. *EMBO J* **26**: 4302–4312.
- Brandina I, Graham J, Lemaitre-Guillier C, Entelis N, Krasheninnikov I, Sweetlove L, Tarassov I, Martin RP. 2006. Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1757**: 1217–1228.
- Conrad RC, Baskerville S, Ellington AD. 1995. In vitro selection methodologies to probe RNA function and structure. *Mol Divers* **1**: 69–78.
- Cusack S, Yaremchuk A, Tukalo M. 1996. The crystal structures of *T. thermophilus* lysyl-tRNA synthetase complexed with *E. coli* tRNA<sup>Lys</sup> and a *T. thermophilus* tRNA<sup>Lys</sup> transcript: Anticodon recognition and conformational changes upon binding of a lysyl-adenylate analogue. *EMBO J* **15**: 6321–6334.
- Duchene AM, Pujol C, Marechal-Drouard L. 2009. Import of tRNAs and aminoacyl-tRNA synthetases into mitochondria. *Curr Genet* **55**: 1–18.
- Entelis NS, Krasheninnikov IA, Martin RP, Tarassov IA. 1996. Mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA<sup>Lys</sup>: Possible roles of aminoacylation and modified nucleosides in subcellular partitioning. *FEBS Lett* **384**: 38–42.
- Entelis NS, Kieffer S, Kolesnikova OA, Martin RP, Tarassov IA. 1998. Structural requirements of tRNA<sup>Lys</sup> for its import into yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* **95**: 2838–2843.
- Entelis NS, Kolesnikova OA, Dogan S, Martin RP, Tarassov IA. 2001. 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *J Biol Chem* **276**: 45642–45653.
- Entelis N, Kolesnikova O, Kazakova H, Brandina I, Kamenski P, Martin RP, Tarassov I. 2002. Import of nuclear encoded RNAs into yeast and human mitochondria: Experimental approaches and possible biomedical applications. *Genet Eng (N Y)* **24**: 191–213.
- Entelis N, Brandina I, Kamenski P, Krasheninnikov IA, Martin RP, Tarassov I. 2006. A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & Dev* **20**: 1609–1620.
- Frechin M, Senger B, Braye M, Kern D, Martin RP, Becker HD. 2009. Yeast mitochondrial Gln-tRNA<sup>Gln</sup> is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. *Genes & Dev* **23**: 1119–1130.
- Goswami S, Chatterjee S, Bhattacharyya SN, Basu S, Adhya S. 2003. Allosteric regulation of tRNA import: Interactions between tRNA domains at the inner membrane of *Leishmania* mitochondria. *Nucleic Acids Res* **31**: 5552–5559.
- Helm M. 2006. Post-transcriptional nucleotide modification and alternative folding of RNA. *Nucleic Acids Res* **34**: 721–733.
- Ishitani R, Nureki O, Nameki N, Okada N, Nishimura S, Yokoyama S. 2003. Alternative tertiary structure of tRNA for recognition by a post-transcriptional modification enzyme. *Cell* **113**: 383–394.
- Juhling F, Morl M, Hartmann RK, Sprinzl M, Stadler PF, Putz J. 2009. tRNAdb 2009: Compilation of tRNA sequences and tRNA genes. *Nucleic Acids Res* **37**: D159–D162.
- Kamenski P, Kolesnikova O, Jubenet V, Entelis N, Krasheninnikov IA, Martin RP, Tarassov I. 2007. Evidence for an adaptation mechanism of mitochondrial translation via tRNA import from the cytosol. *Mol Cell* **26**: 625–637.
- Kazakova HA, Entelis NS, Martin RP, Tarassov IA. 1999. The aminoacceptor stem of the yeast tRNA<sup>Lys</sup> contains determinants of mitochondrial import selectivity. *FEBS Lett* **442**: 193–197.
- Kobitski AY, Nierth A, Helm M, Jaschke A, Nienhaus GU. 2007. Mg<sup>2+</sup>-dependent folding of a Diels-Alderase ribozyme probed by single-molecule FRET analysis. *Nucleic Acids Res* **35**: 2047–2059.
- Kobitski AY, Hengesbach M, Helm M, Nienhaus GU. 2008. Sculpting an RNA conformational energy landscape by a methyl group modification—a single-molecule FRET study. *Angew Chem Int Ed Engl* **47**: 4326–4330.
- Kohrer C, Xie L, Kellerer S, Varshney U, RajBhandary UL. 2001. Import of amber and ochre suppressor tRNAs into mammalian cells: A general approach to site-specific insertion of amino acid analogues into proteins. *Proc Natl Acad Sci* **98**: 14310–14315.
- Kolesnikova OA, Entelis NS, Mireau H, Fox TD, Martin RP, Tarassov IA. 2000. Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science* **289**: 1931–1933.
- Kolesnikova O, Entelis N, Kazakova H, Brandina I, Martin RP, Tarassov I. 2002. Targeting of tRNA into yeast and human mitochondria: The role of anticodon nucleotides. *Mitochondrion* **2**: 95–107.
- Kolesnikova OA, Entelis NS, Jacquin-Becker C, Goltzene F, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Lightowlers RN, Martin RP, Tarassov I. 2004. Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum Mol Genet* **13**: 2519–2534.
- Kurschat WC, Muller J, Wombacher R, Helm M. 2005. Optimizing splinted ligation of highly structured small RNAs. *RNA* **11**: 1909–1914.
- Madore E, Florentz C, Giege R, Lapointe J. 1999. Magnesium-dependent alternative foldings of active and inactive *Escherichia coli* tRNA<sup>Glu</sup> revealed by chemical probing. *Nucleic Acids Res* **27**: 3583–3588.
- Mahata B, Mukherjee S, Mishra S, Bandyopadhyay A, Adhya S. 2006. Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells. *Science* **314**: 471–474.
- Martin RP, Schneller JM, Stahl AJ, Dirheimer G. 1977. Study of yeast mitochondrial tRNAs by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis: Characterization of isoaccepting species and search for imported cytoplasmic tRNAs. *Nucleic Acids Res* **4**: 3497–3510.

- Mukherjee S, Basu S, Home P, Dhar G, Adhya S. 2007. Necessary and sufficient factors for the import of transfer RNA into the kinetoplast mitochondrion. *EMBO Rep* **8**: 589–595.
- Peterson ET, Blank J, Sprinzl M, Uhlenbeck OC. 1993. Selection for active *E. coli* tRNA<sup>Phe</sup> variants from a randomized library using two proteins. *EMBO J* **12**: 2959–2967.
- Peterson ET, Pan T, Coleman J, Uhlenbeck OC. 1994. In vitro selection of small RNAs that bind to *Escherichia coli* phenylalanyl-tRNA synthetase. *J Mol Biol* **242**: 186–192.
- Piasecki SK, Hall B, Ellington AD. 2009. Nucleic acid pool preparation and characterization. *Methods Mol Biol* **535**: 3–18.
- Radman-Livaja M, Biswas T, Mierke D, Landy A. 2005. Architecture of recombination intermediates visualized by in-gel FRET of  $\lambda$  integrase–Holliday junction–arm DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci* **102**: 3913–3920.
- Rinehart J, Krett B, Rubio MA, Alfonzo JD, Soll D. 2005. *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes & Dev* **19**: 583–592.
- Rubio MA, Liu X, Yuzawa H, Alfonzo JD, Simpson L. 2000. Selective importation of RNA into isolated mitochondria from *Leishmania tarentolae*. *RNA* **6**: 988–1003.
- Rubio MA, Rinehart JJ, Krett B, Duvezin-Caubet S, Reichert AS, Soll D, Alfonzo JD. 2008. Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proc Natl Acad Sci* **105**: 9186–9191.
- Rusconi CP, Cech TR. 1996. Mitochondrial import of only one of three nuclear-encoded glutamine tRNAs in *Tetrahymena thermophila*. *EMBO J* **15**: 3286–3295.
- Salinas T, Schaeffer C, Marechal-Drouard L, Duchene AM. 2005. Sequence dependence of tRNA<sup>Gly</sup> import into tobacco mitochondria. *Biochimie* **87**: 863–872.
- Salinas T, Duchene AM, Marechal-Drouard L. 2008. Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends Biochem Sci* **33**: 320–329.
- Shi H, Moore PB. 2000. The crystal structure of yeast phenylalanine tRNA at 1.93 Å resolution: A classic structure revisited. *RNA* **6**: 1091–1105.
- Smirnov A, Tarassov I, Mager-Heckel AM, Letzelter M, Martin RP, Krashennikov IA, Entelis N. 2008. Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria. *RNA* **14**: 749–759.
- Smith CJ, Ley AN, D’Obrenan P, Mitra SK. 1971. The structure and coding specificity of a lysine transfer ribonucleic acid from the haploid yeast *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$  S288C. *J Biol Chem* **246**: 7817–7819.
- Sun X, Mierke DF, Biswas T, Lee SY, Landy A, Radman-Livaja M. 2006. Architecture of the 99 bp DNA–six-protein regulatory complex of the  $\lambda$  att site. *Mol Cell* **24**: 569–580.
- Tarassov I, Entelis N, Martin R. 1995. Mitochondrial import of a cytoplasmic lysine-tRNA in yeast is mediated by cooperation of cytoplasmic and mitochondrial lysyl-tRNA synthetases. *EMBO J* **14**: 3461–3471.
- Tarassov I, Kamenski P, Kolesnikova O, Karicheva O, Martin RP, Krashennikov IA, Entelis N. 2007. Import of nuclear DNA-encoded RNAs into mitochondria and mitochondrial translation. *Cell Cycle* **6**: 2473–2477.
- Taylor RW, Turnbull DM. 2005. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Nat Rev Genet* **6**: 389–402.
- Taylor RW, Chinnery PF, Turnbull DM, Lightowlers RN. 1997. Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication in vitro by peptide nucleic acids. *Nat Genet* **15**: 212–215.
- Tuerk C, Gold L. 1990. Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase. *Science* **249**: 505–510.
- Walter NG. 2003. Probing RNA structural dynamics and function by fluorescence resonance energy transfer (FRET). In *Current protocols in nucleic acid chemistry* (ed. SL Beaucage et al.), Chap. 11, Unit 11.10. Wiley, New York.
- Zagryadskaya EI, Kotlova N, Steinberg SV. 2004. Key elements in maintenance of the tRNA L-shape. *J Mol Biol* **340**: 435–444.



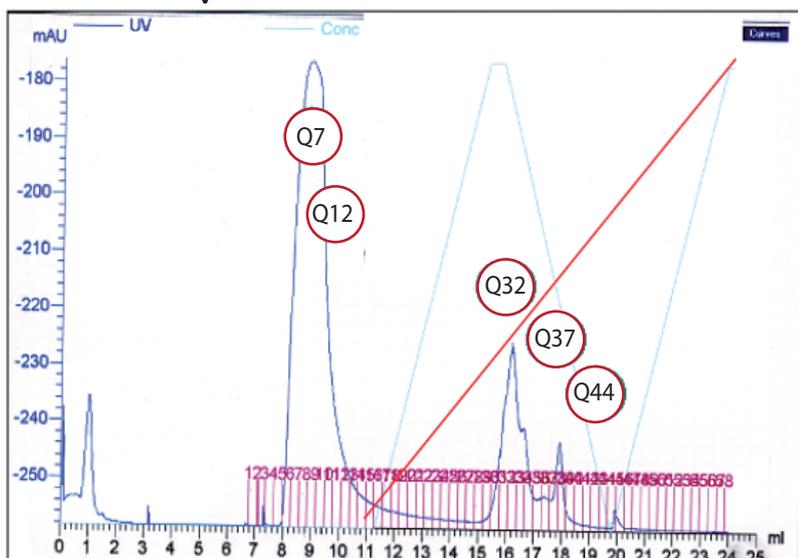
A

## Sephacryl G-200

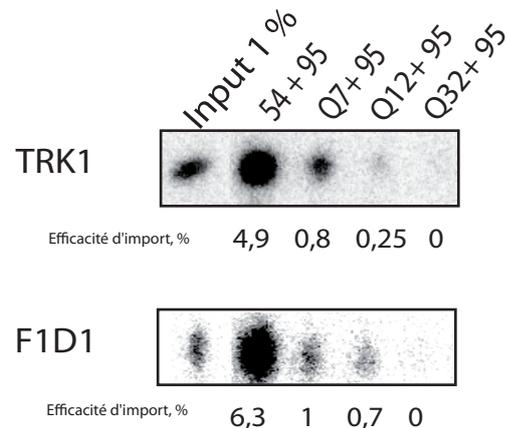
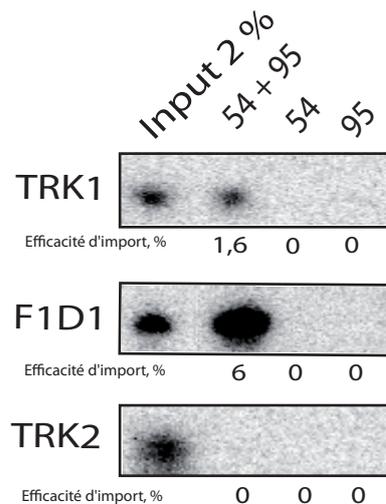


54

## Mono-Q



B



**Figure 15: Détermination de la capacité des fractions obtenues par séparation chromatographique de protéines HepG2 à diriger l'import des ARN dans les mitochondries isolées.**

A) Panel du dessus: Profil chromatographique de la gel filtration Sephacryl G-200

Panel du dessous: Profil de la chromatographie échangeuse d'ions MonoQ utilisée pour fractionner la fraction 54 de la gel filtration.

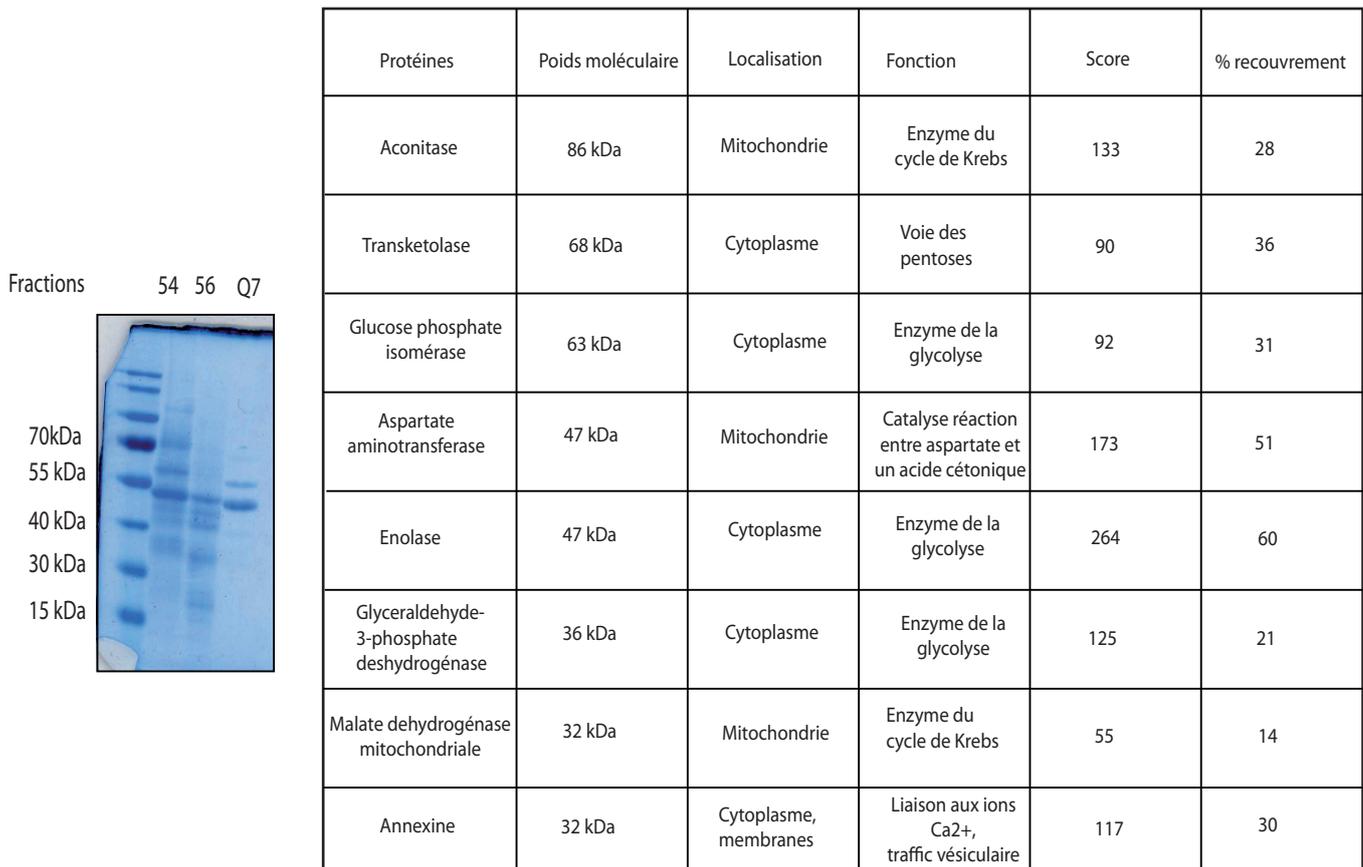
Les numéros entourés d'un cercle correspondent aux fractions testées pour leur capacité à diriger l'import. Axe des ordonnées: Temps en minutes. Axe des abscisses: Unité arbitraire. Droite rouge: gradient de NaCl.

B) Autoradiographie de gels dénaturants correspondant aux tests d'importation réalisés en présence des fractions obtenues par gel filtration et MonoQ. Les efficacités d'import des ARN sont indiquées sous chaque gel. Les ARN testés sont indiqués à gauche du gel et les fractions protéiques au dessus. L'input correspond au pourcentage de la quantité d'ARN de départ déposé sur gel.

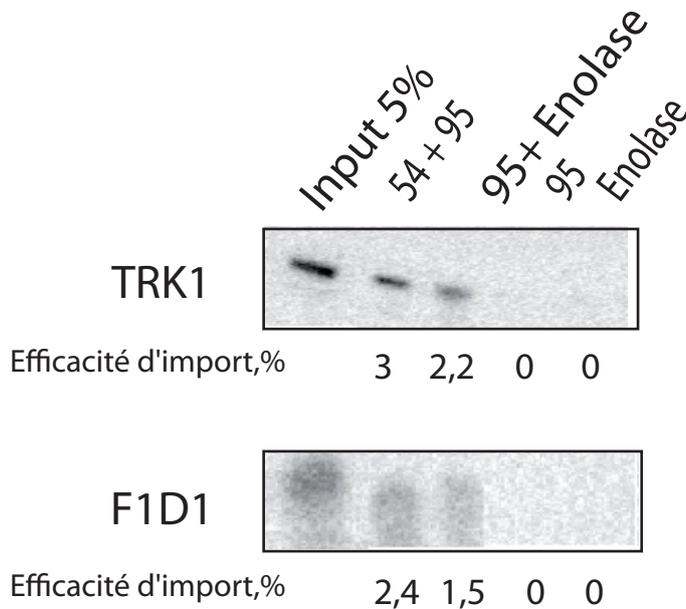
#### 4 Résultats complémentaires : Etude du mécanisme d'import de TRK1 et de F1D1 dans les mitochondries humaines.

Les résultats présentés dans cet article démontrent que les ARN TRK1 et F1D1 sont importables dans les mitochondries humaines *in vivo* et *in vitro*. Ces ARN n'étant normalement pas présents dans les cellules humaines, ces résultats soulèvent la question du mécanisme qui préside à cet adressage. Plusieurs études réalisées antérieurement au laboratoire ont permis de répondre partiellement à cette question en se basant sur les tests d'importation *in vitro* (Entelis et al, 2001). En jouant sur différents paramètres, ces tests ont permis de mettre en évidence que l'import de TRK1 dans des mitochondries humaines isolées semblait requérir les mêmes impératifs que son import chez la levure. Ainsi, tous deux nécessitent la présence d'ATP, de récepteurs protéiques exposés à la membrane externe de la mitochondrie, d'un gradient de proton et de facteurs cytosoliques solubles. Les extraits bruts de protéines permettant de diriger l'import de TRK1 dans les mitochondries humaines peuvent non seulement provenir de la levure mais également être d'origine humaine. Ceci laisse supposer que la cellule humaine détient tous les facteurs nécessaires à l'import de TRK1. De plus, lorsque TRK1 et TRK2 sont exprimés dans des cellules humaines, seul TRK1 est importé. La discrimination entre les deux ARN étant conservée chez l'homme, il est probable qu'elle repose sur les mêmes mécanismes que chez la levure, et qu'elle se fasse donc par l'intermédiaire des mêmes facteurs cytosoliques, à savoir l'énolase et le pré lysyl ARNt synthetase.

Afin d'investiguer cette hypothèse, nous avons entrepris de fractionner l'extrait de protéines brutes utilisé pour l'import *in vitro* des ARN TRK1 et F1D1 dans les mitochondries humaines isolées. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps séparé les protéines par gel filtration en déposant 14 mg de protéines isolées à partir de cellules humaines HepG2 sur une colonne Sephacryl S-200. Le profil d'élution est présenté dans la **figure 15A**. Différentes fractions de protéines séparées en fonction de leur taille ont été obtenues. Ces fractions ont été testées pour leur capacité à diriger l'import de TRK1 et de F1D1 dans les mitochondries humaines isolées. Aucun import n'a cependant pu être obtenu en présence des fractions testées prises séparément. Toutefois, la combinaison de deux de ces fractions, les fractions 54 et 95, a permis d'obtenir une importation à la fois pour TRK1 et F1D1. (**Figure 15B**) Les efficacités d'import, correspondant à la quantité d'ARN présent dans les mitochondries par



**Figure 16: Protéines de la fraction Q7 identifiées par spectrométrie de masse Maldi-MS et NanoLC-MS/MS.**  
 A gauche: Coloration au bleu de Coomassie des protéines de la fraction 54, 56 et Q7  
 A droite: Tableau représentant les protéines identifiées dans la fraction Q7



**Figure 17: Autoradiographie de gels dénaturants correspondant aux tests d'importation réalisés en présence des fractions 54, 95 et d'énolase.**  
 Les gels sont annotés tel que décrit en figure 1.

rapport à la quantité de départ, sont données à titre indicatif en dessous de chaque gel. Il est à noter qu'elles ne peuvent être comparées que si les tests d'import des différents ARN ont été réalisés en même temps. Les résultats obtenus ici laissent supposer que l'import des ARN TRK1 et F1D1 se fait d'une part par l'intermédiaire des mêmes facteurs cytosoliques, et d'autre part que ces facteurs sont au moins au nombre de deux.

La fraction 54 étant encore riche en protéines, elle a ensuite été soumise à une chromatographie échangeuse d'ions sur support Mono Q. Le profil d'élution est représenté en **figure 15A**. Les fractions qui se sont révélées capables de diriger l'import en présence de la fraction 95 sont les fractions correspondant aux protéines non retenues, nommées Q7 et Q12. La fraction Q7 permet une importation des ARN plus élevée que la fraction Q12, ses protéines ont été déposées sur gel dénaturant et les différentes bandes obtenues ont été identifiées par spectrométrie de masse Maldi-Tof. Les protéines identifiées, leur masse moléculaire, leur fonction, leur score et le pourcentage de recouvrement sont représentés **figure 16**. Il est intéressant de noter que la plupart de ces protéines sont des enzymes jouant un rôle dans le métabolisme cellulaire, importées dans la mitochondrie (Aconitase, Transketolase, malate deshydrogenase) ou localisées à proximité de la membrane externe de cette dernière (Glyceraldéhyde-3-phosphate deshydrogénase, glucose phosphate isomérase et émolase) comme cela a été démontré dans une étude réalisée antérieurement au laboratoire (Brandina et al, 2006). Ces protéines pourraient donc toutes être des candidats potentiels pour adresser l'ARN à la surface ou dans la matrice de la mitochondrie. Toutefois, la protéine que nous suspicions dès le départ jouer un rôle dans l'import, l'émolase, s'est révélée être non seulement présente dans la fraction Q7 mais posséder de plus le score et le pourcentage de recouvrement les plus élevés. Afin de vérifier son implication dans l'import de TRK1 et de F1D1, de l'émolase de lapin a été utilisée en remplacement de la fraction Q7 (**Figure 17**). L'import de TRK1 et de F1D1 obtenu en présence de la fraction 95 et d'émolase de lapin semble démontrer que cette protéine est bien le facteur d'import compris dans la fraction Q7. Il semblerait donc que les facteurs permettant l'import de TRK1 et F1D1 dans les mitochondries humaines soient les mêmes que ceux de la levure *S. Cerevisiae*, à savoir l'émolase et la pré-lysyl-ARNt-synthétase. La fraction 95 étant trop pauvre en protéine pour pouvoir identifier si elle contient la synthétase, cette étude reste à poursuivre afin de produire cette protéine à l'aide d'un plasmide recombinant et de pouvoir étudier son impact sur l'import des ARN TRK1 et F1D1.



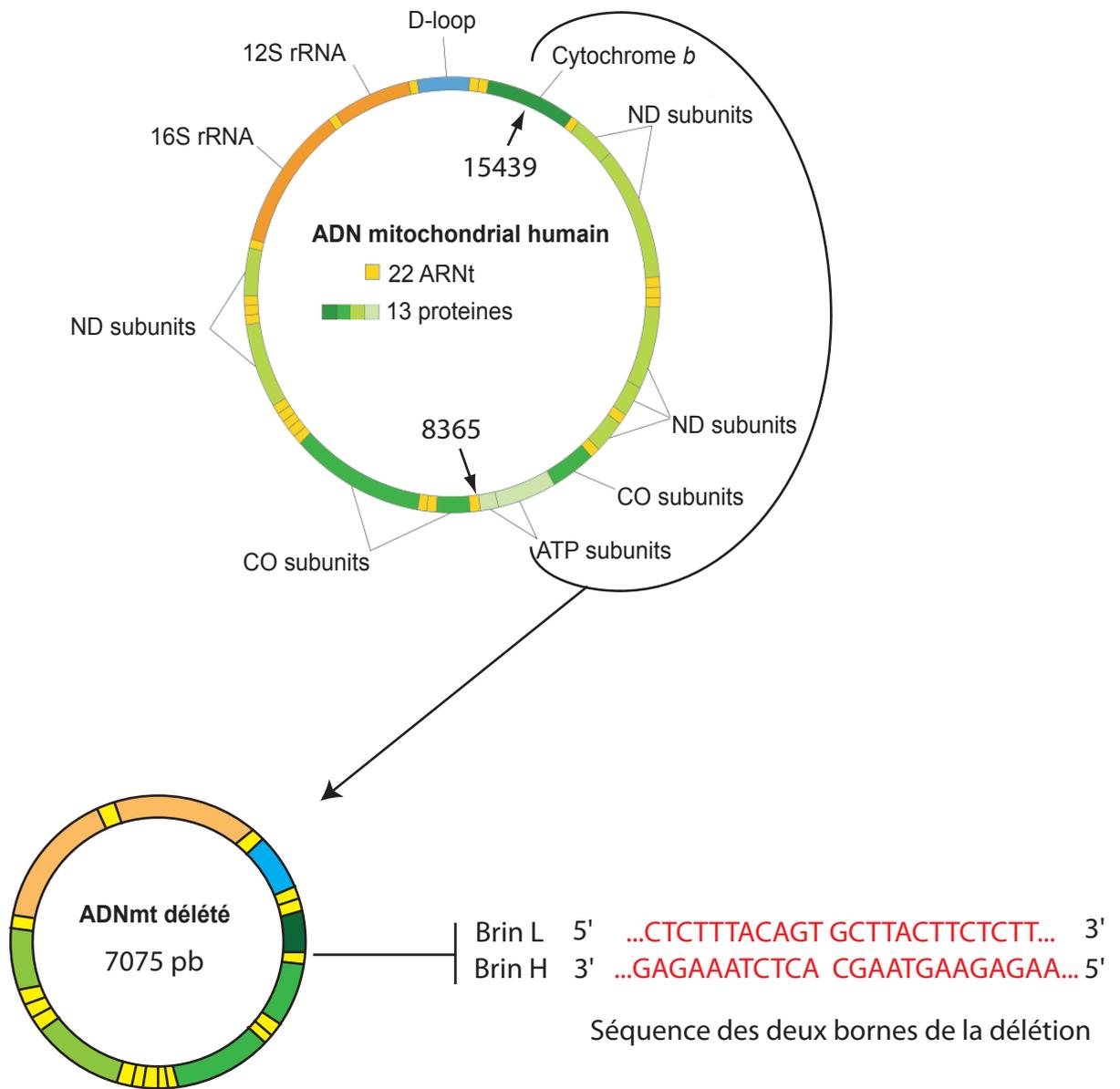
## **II Modélisation de la thérapie anti-génomique dans des cellules humaines par l'utilisation de la voie d'import des ARN dans les mitochondries**

La construction de l'ARN artificiel F1D1 nous a permis d'envisager son utilisation dans le cadre de la stratégie anti-génomique. En effet sa grande efficacité d'import, sa petite taille et la relative simplicité de sa structure en font un vecteur de choix pour importer dans la mitochondrie des oligonucléotides complémentaires à l'ADNmt muté. Des ARN recombinants au potentiel anti-répliatif ont donc été construits en insérant ces oligonucléotides dans la structure de l'ARN F1D1 et leur effet sur la réplication *in vitro* de l'ADNmt a été testé. Une fois le potentiel de ces ARN évalué, leur stabilité, leur import ainsi que leur effet sur le taux d'hétéroplasmie ont été testés dans des cellules humaines en cultures. Les travaux présentés ci-dessous ont fait l'objet d'une publication actuellement en cours de soumission et présentée à la fin de ce chapitre.

### **1 Modèle d'étude**

Le potentiel de la stratégie anti-génomique a pour la première fois été démontré en utilisant des PNA, oligonucléotides artificiels capables *in vitro* d'inhiber spécifiquement la réplication d'un fragment d'ADNmt porteur d'une délétion mais également d'une mutation ponctuelle (Taylor et al, 1997).

Le squelette des PNA ne contient pas de groupements phosphate (chargés négativement), ce qui a pour conséquence que la liaison PNA/ADN est plus forte qu'une liaison ADN/ADN classique du fait de l'absence de répulsion électrostatique. De ce fait, les PNA ont également la caractéristique d'avoir une haute spécificité de liaison, le duplex PNA/DNA étant plus fortement déstabilisé par la présence d'un mésappariement qu'un duplex ADN/ADN ou ARN/ADN (Wang & Xu, 2004). Notre étude se basant sur la formation d'un duplex ADN/ARN, nous avons choisi d'utiliser pour une première approche un modèle reposant sur une délétion. Dans cette situation, l'écart entre la température de fusion du duplex ARN/ADN muté (hybridation totale de l'ARN aux deux bornes de la délétion) et ARN/ADN sauvage (hybridation d'une moitié de l'insert à une seule borne de la délétion)



**Figure 18 : Représentation du modèle utilisé pour la stratégie anti-génomique.**

Panel du haut: ADN mitochondrial humain. Les flèches indiquent les positions des nucléotides 15439 et 8365 entre lesquels la délétion a eu lieu.

Panel du bas: ADN mitochondrial humain délété. La séquence des deux bornes de la délétion est représentée à droite.

sera, selon la longueur de l'ARN complémentaire à l'ADNmt délété, suffisant pour qu'une discrimination puisse se faire à 37°C.

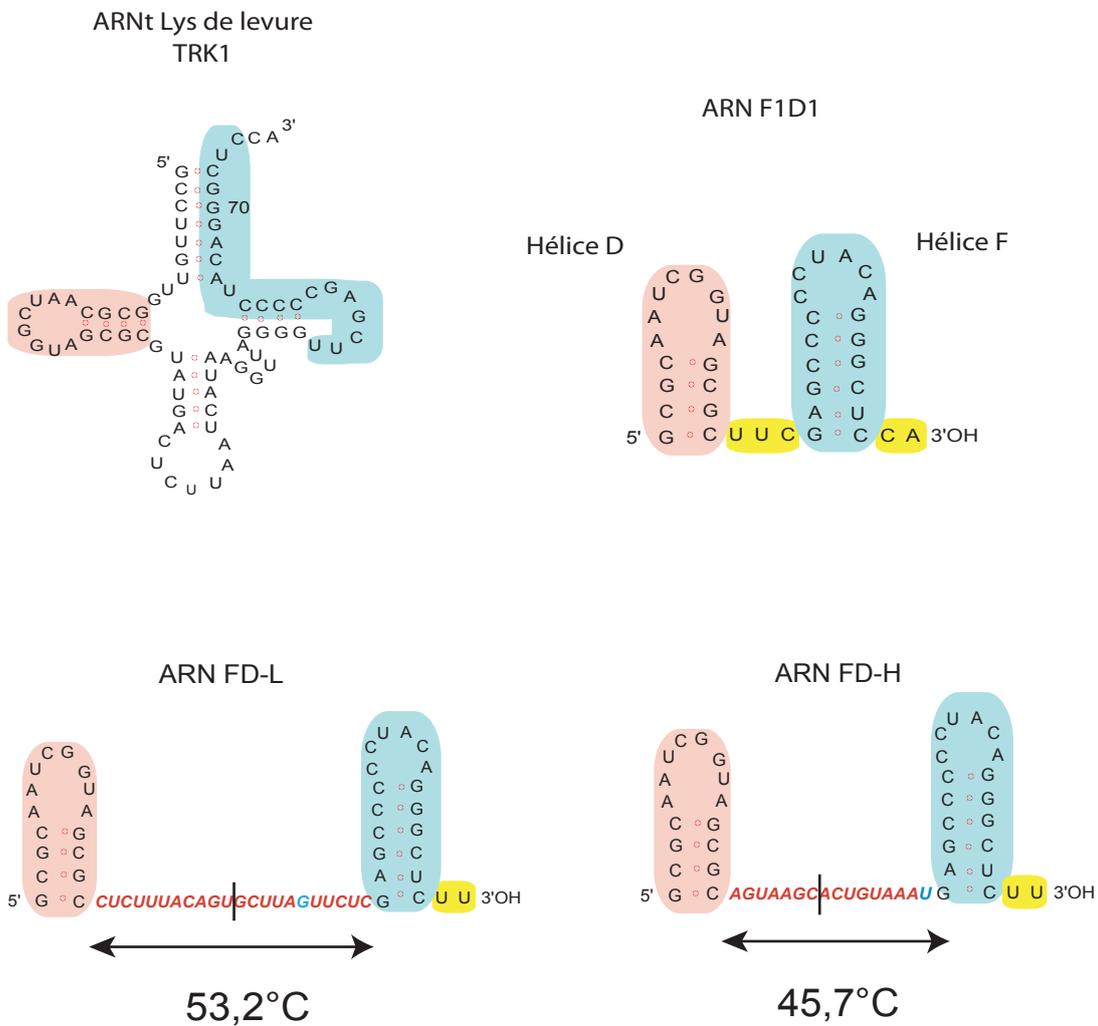
La deuxième considération entrant en jeu dans le choix du modèle a consisté à ce que la mutation se situe préférentiellement entre les origines de réplication OH et OL, afin de pouvoir cibler le brin H prédit comme étant simple brin entre ces deux points dans le modèle de la réplication dit non synchrone.

Notre modèle d'étude repose par conséquent sur une large délétion de 7075 pb dans l'ADNmt associée à un cas de syndrome de Kearns-Sayre détecté chez un patient âgé de 15 ans dans la laboratoire de Anne Lombes (*CRICM, Paris*). L'amplification de la région de la délétion par PCR, son clonage dans un plasmide pUC119 suivi de son séquençage nous a permis de déterminer que la délétion se situe entre les nucléotides 8363 et 15438 au niveau des gènes du cytochrome B et de l'ARNt<sup>Lys</sup>. Il en résulte une molécule d'ADNmt muté de 9497 pb auquel il manque les gènes ND3, ND4, ND4L, ND5, ND6, Cox III, ATP6, ATP8, une partie du cytochrome B et six ARNt (**Figure 18**)

## **2 Utilisation de l'ARN F1D1 pour la construction d'ARN recombinants au potentiel anti-répliatif**

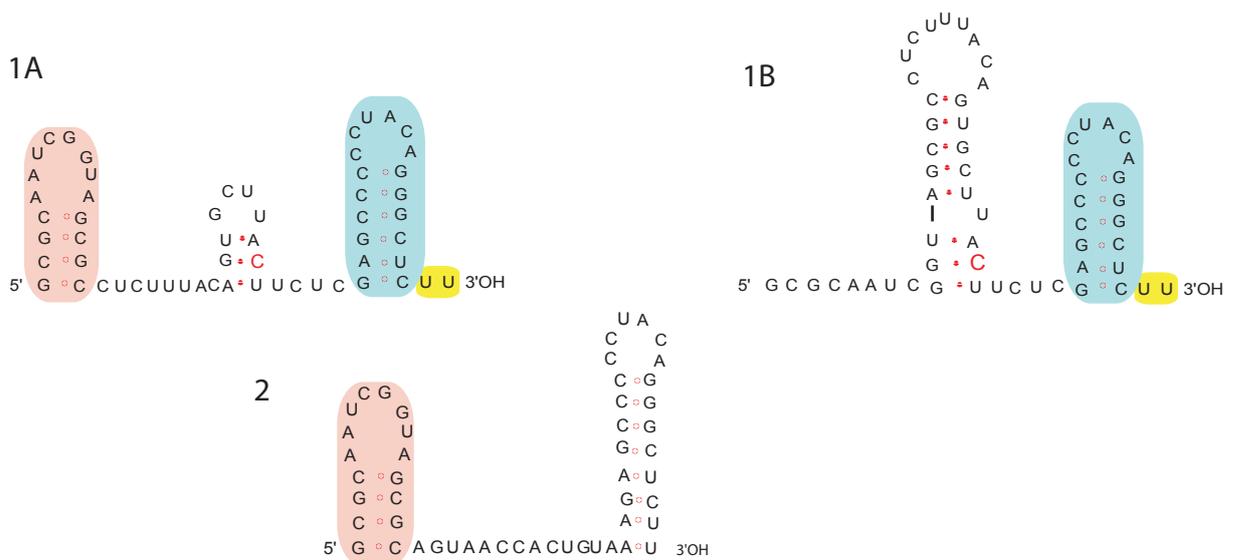
Les ARN anti-répliatifs ont été construits en insérant dans la structure de l'ARN F1D1 des oligonucléotides ribonucléotidiques complémentaires aux deux bornes de la délétion du brin H ou du brin L de l'ADNmt délété. L'endroit de l'insertion se situe entre les hélices D et F de l'ARN F1D1 afin de protéger potentiellement les inserts de l'action des exonucléases. Les structures en résultant ont ensuite été modélisées par le logiciel Mfold. Ce logiciel permet de prédire à partir d'une séquence ARN les structures secondaires potentiellement adoptées par cette dernière à 37°C. Deux grands types de critères ont été conjointement pris en compte pour la construction des ARN recombinants.

La première catégorie de considérations s'est portée sur l'insert en lui-même. En effet pour la stratégie anti-génomique, et comme décrit précédemment, il est primordial que l'insert soit capable de discriminer l'ADNmt muté de l'ADNmt sauvage. L'insert doit par conséquent être assez long pour se lier de façon stable aux bornes de la délétion de l'ADNmt muté sans toutefois se lier à l'une des bornes de l'ADNmt sauvage à 37°C. Tout d'abord, les



**Figure 19 : Structure des ARN FD-L et FD-H prédites par MFold.**

L'hélice D de TRK1 est en rose, l'hélice alternative F en bleu. Les bases en bleu dans l'insert correspondent aux mismatch. Le trait au milieu de l'insert représente la limite des deux bornes de la délétion. Les températures de fusion de chaque insert sont représentées sous les ARN.



**Figure 20 : Structures alternatives**

**1A et 1B :** Structures alternatives de l'ARN FD-L avec une cytidine en 17e position de l'insert (indiqué en rouge)

**2:** Structure alternative de l'ARN FD-H sans l'uridine en 16e position de l'insert

inserts ont été construits de façon à ce qu'un nombre équivalent de bases soit présent de chaque côté de la borne de la délétion. La température de fusion des inserts avec l'ADNmt a été évaluée en utilisant le logiciel OligoCalc (Kibbe, 2007) en se basant sur l'algorithme « salt adjusted ». Le calcul de la température de fusion est réalisé à pH 7 pour une concentration en oligonucléotide (ici l'insert ARN) de 50nM et en cation monovalent ( $\text{Na}^+$  et  $\text{K}^+$ ) de 150mM. La formule ne prend pas en compte la concentration en cation bivalent ( $\text{Mg}^{2+}$  et  $\text{Mn}^{2+}$ ), bien que leur présence ou leur absence puisse affecter la formation du duplex (Nakano et al, 1999).

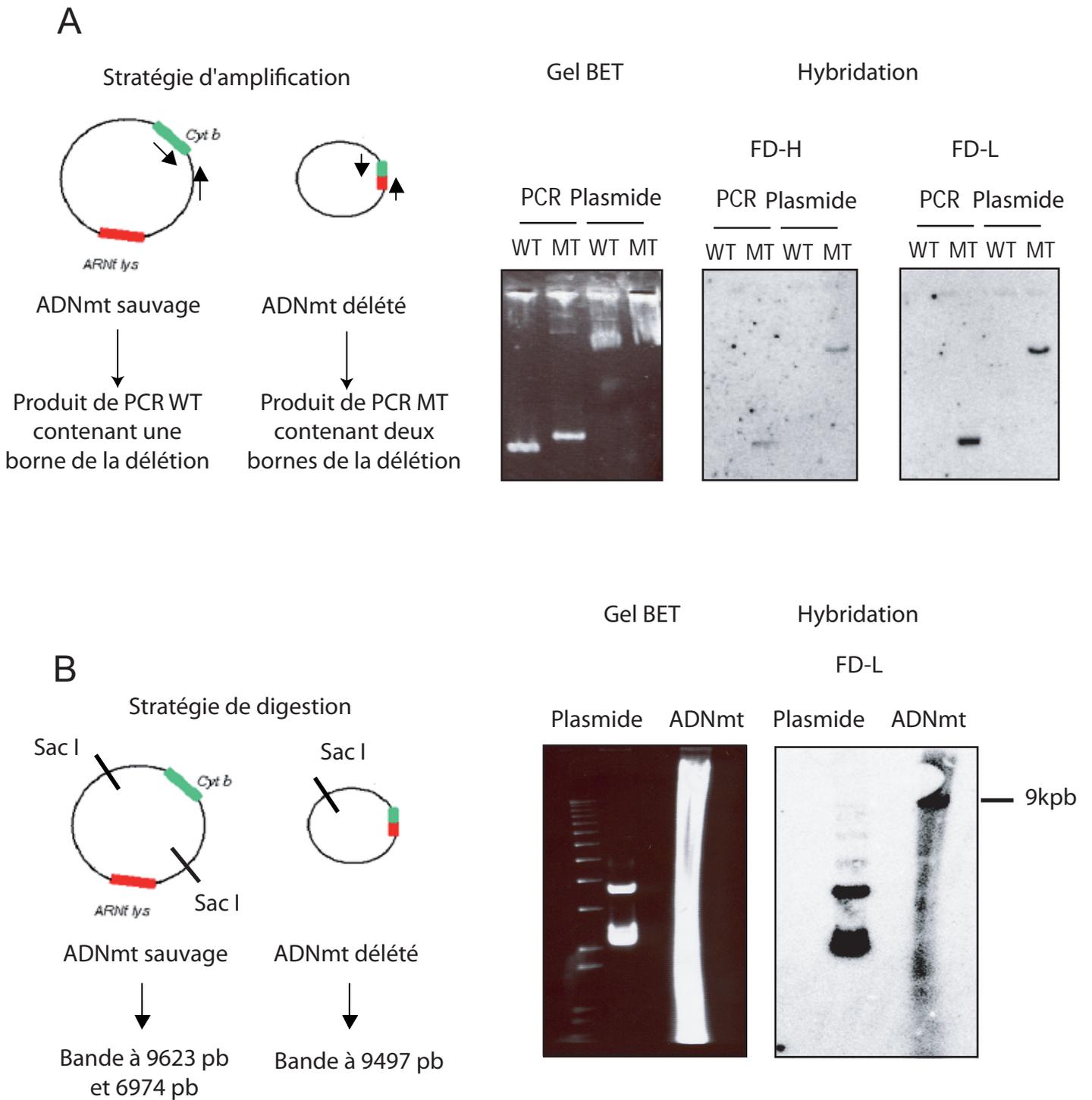
La seconde catégorie de considérations prise en compte pour la construction des ARN recombinants a consisté à évaluer l'impact de l'insertion de la séquence complémentaire à l'ADNmt muté sur la structure secondaire de l'ARN F1D1. Les préoccupations se sont portées sur le maintien de l'intégrité de la structure des déterminants d'importation que sont les hélices D et F ainsi que sur le maintien de l'insert sous forme simple brin.

L'ensemble de ces considérations ont conduit à sélectionner deux ARN pour lesquels Mfold ne prédit qu'une seule structure et dans lesquelles l'insert est simple brin sur toute sa longueur (**Figure 19**):

- L'ARN FD L contenant un insert de 22 bases se liant au brin H de l'ADNmt délété.
- L'ARN FD H contenant un insert de 15 bases se liant au brin L de l'ADNmt délété.

Les inserts de 22 bases pour FD-L et de 15 bases pour FD-H correspondent à la longueur maximum qui puisse être intégrée pour chacun des ARN sans que cela ne détruise la structure de l'ARN. La température de fusion de l'insert de 22 bases est de 53,2°C et de 45,7°C pour l'insert de 15 bases.

La construction de FD-L et FD-H a nécessité l'introduction au niveau de l'insert de bases ne s'hybridant pas à l'ADNmt. L'ARN FD-L contient ainsi un mésappariement au niveau de la 17<sup>e</sup> base de l'insert, remplaçant une cytidine par une guanine. De même un résidu uracile a été ajouté entre l'insert de 15 bases et l'hélice F de l'ARN FD-H. Les structures alternatives obtenues sans ces ajustements sont représentées en **figure 20** La présence d'une cytidine en 17<sup>e</sup> position de l'insert de FD-L détruit la structure de l'hélice D dans la structure alternative 1B et induit la formation d'une troisième hélice au niveau de l'insert dans la structure 1A. L'absence du résidu uracile en 16<sup>e</sup> position de l'insert détruit quant à elle la structure de l'hélice F dans la structure alternative 2. Pour les deux ARN les résidus CA en 3'



**Figure 21: Etude de la spécificité d'hybridation des ARN FD-L et FD-H à des fragments ADNmt muté et sauvage par hybridation sur Southern.**

A) Hybridation des ARN aux plasmides et produits de PCR MT correspondant aux deux bornes de la délétion et WT correspondant à une borne de la délétion.

B) Hybridation des ARN à l'ADNmt extrait de cellules digéré par l'enzyme de restriction SacI.

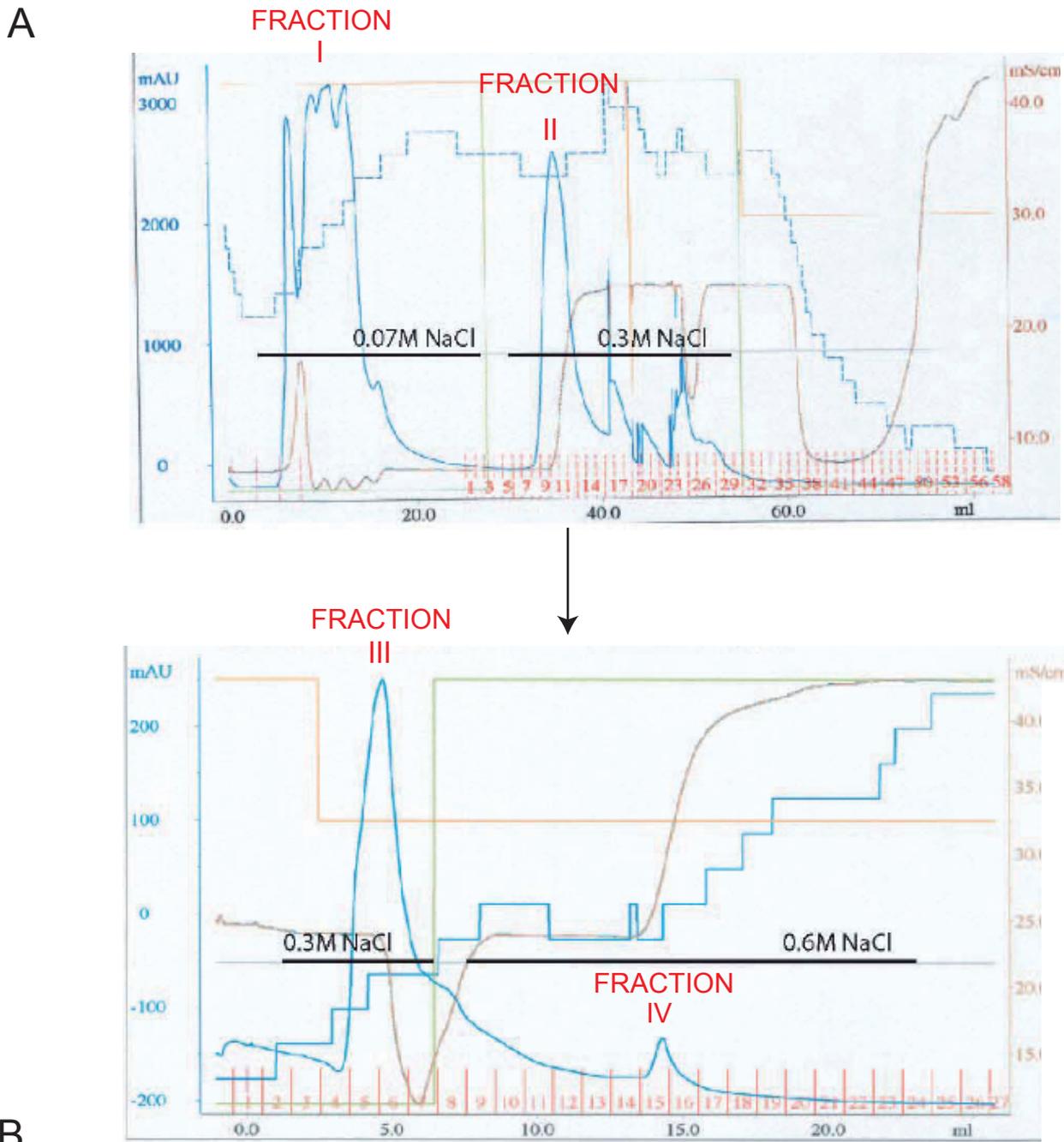
de F1D1 ont été remplacés par deux uridines. Après ces ajustements, le logiciel Mfold ne prédit plus qu'une seule structure pour FD-L et FD-H.

Un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) a été effectué pour s'assurer que les séquences des inserts de 22 et 15 bases n'étaient pas présentes dans l'ADNmt sauvage. Comme prévu, un alignement a été prédit entre la moitié de chaque insert et l'ADNmt sauvage. D'autres régions de l'ADNmt peuvent également être ciblées par les deux types d'insert correspondant à des séquences de 10 bases au maximum pour FD-L et des séquences de 9 bases maximum pour FD-H.

### 3 Evaluation *in vitro* du potentiel des ARN recombinants

#### 3.1 Etude de la spécificité d'hybridation des ARN recombinants à l'ADNmt muté

La température d'hybridation des inserts calculée ci-dessus est théorique et peut varier énormément en fonction de l'algorithme utilisé ainsi que des paramètres utilisés tels que de la concentration en ARN, en ADN ainsi que de celle en cations. La capacité des inserts à s'hybrider spécifiquement avec une matrice ADN mutée a donc été testée *in vitro* par hybridation sur Southern. Des produits de PCR correspondant à un fragment d'ADNmt sauvage de 430 pb (nucléotides 15251 à 15680) soit à un fragment d'ADNmt muté de 512 pb (nucléotides 8099 à 8365 et 15438 à 15680) ont été déposés sur gel d'agarose avec les plasmides ayant servi de matrice à leur amplification. Après transfert de l'ADN sur membrane, cette dernière a été hybridée avec les ARN recombinants marqués radioactivement au  $^{32}\text{P}$ . Afin que l'ARN puisse être replié dans sa conformation native et que la formation du duplex puisse se faire au plus près des conditions physiologiques, l'hybridation est réalisée à 37°C dans du tampon PBS (**Figure 21 A**). Cette technique a permis de visualiser que dans ces conditions, non seulement les ARN recombinants pouvaient s'hybrider à l'ADN mais qu'ils étaient capables de discriminer l'ADN délété de l'ADN sauvage. Il semblerait toutefois que l'insert à la  $T_m$  la plus basse, l'insert de 15 bases, s'hybride de façon moins efficace que l'insert de 22 bases pour lequel un signal de plus haute intensité est obtenu. L'hybridation de l'ARN FD-H directement avec l'ADNmt extrait de cellules humaines contenant l'ADNmt délété a également été testé. Pour ce faire, l'ADNmt a été digéré par l'enzyme de restriction SacI coupant l'ADNmt en position 40 et 9663 aboutissant à trois produits de tailles



Fractions	Concentration protéique µg/µl	Activité spécifique cpm/µg
I	13,4	1531
II	0,7	30439
III	0,1	823

**Figure 22: Purification d'une fraction protéique enrichie en ADN polymérase mitochondriale.**

**A)** Panel du haut: Profil de fractionnement de protéines de mitochondries de foie de boeuf sur DEAE cellulose.

Panel du bas: Profil de fractionnement de la fraction II sur Phosphocellulose P11.

**B)** Contrôle de l'activité enzymatique des fractions protéiques purifiées (incorporation de dCTP marqué au p32 dans un fragment d'ADN synthétisé en présence des fractions protéiques I, II et III).

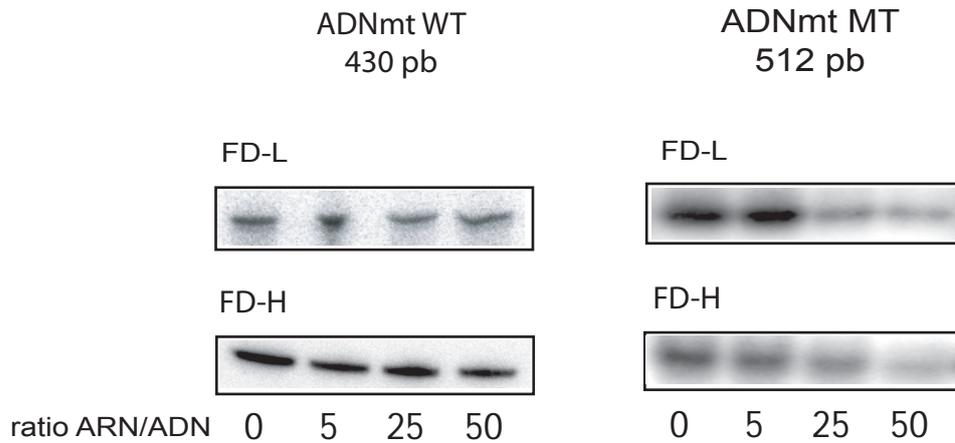
différentes, l'un de 9497 bases correspondant à l'ADNmt délété et deux autres de 6974 et 9623 bases correspondant à l'ADNmt sauvage (**Figure 21 B**). L'ADNmt n'a été que partiellement purifié ce qui explique le « smear » d'ADN total digéré par Bgl II. On observe une hybridation avec un fragment d'ADN aux environs de 9000 bases. On ne peut pas exclure que l'ARN FD-L s'hybride à la fois à la bande de 9497b de l'ADNmt délété et 9623b de l'ADNmt sauvage mais aucune hybridation n'est observée avec le fragment de 6974b de l'ADNmt sauvage. Il semblerait donc que l'ARN FD-L puisse également discriminer l'ADNmt sauvage de l'ADNmt délété.

## 3.2 Etude de l'effet des ARN recombinants par l'élaboration d'un test de réplication

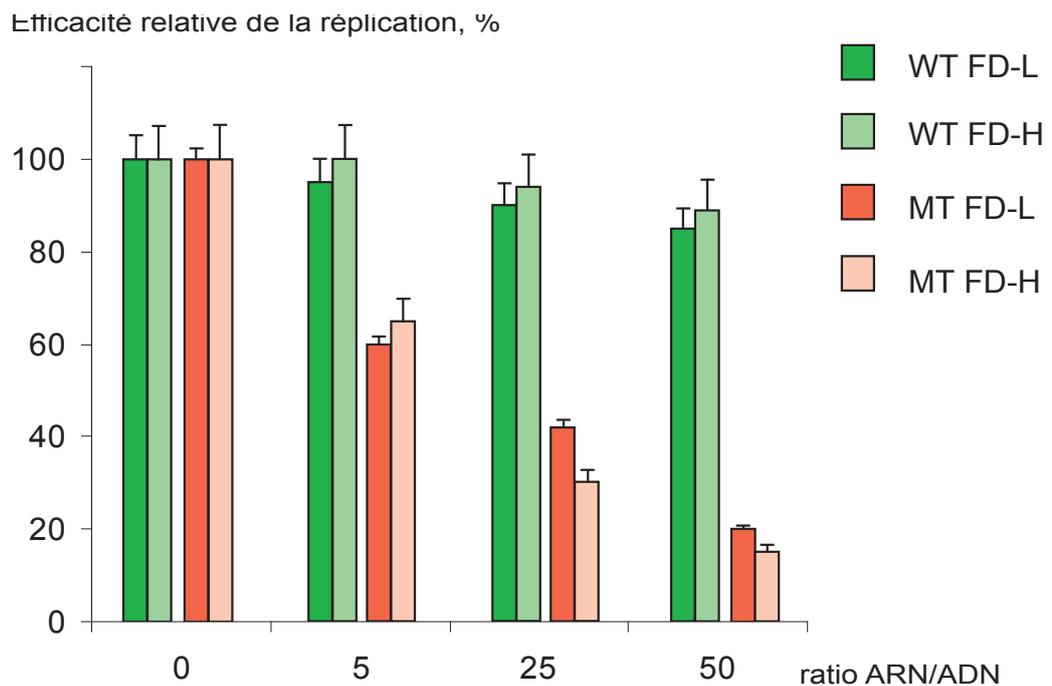
### 3.2.1 Elaboration du test de réplication

Après avoir testé la capacité des ARN recombinants à se lier de façon spécifique à l'ADNmt délété, nous avons voulu évaluer leur capacité à bloquer la processivité de la polymérase mitochondriale  $\gamma$  dans un système de réplication *in vitro*. Ce test a été élaboré selon le protocole décrit par Clayton en 1985 (Wong & Clayton, 1985). Conformément à cette méthode, deux fractions protéiques I et II ont été obtenues à partir de foie de bœuf par chromatographie échangeuse d'anions DEAE-cellulose. Une partie de la fraction II a ensuite été déposée sur colonne de phosphocellulose et une fraction III correspondant aux protéines non retenues et une fraction IV supposée être enrichie en polymérase  $\gamma$  ont été obtenues (**Figure 22A**). Ces fractions protéiques ont ensuite été testées pour leur capacité à polymériser l'ADN en les incubant avec une matrice ADN, des amorces aléatoires et des nucléotides dont du [ $\alpha$ - $^{32}$ P] dCTP. L'activité spécifique de chaque fraction (cpm de dCTP incorporés dans l'ADN synthétisé par  $\mu$ g de protéine) est représentée en **figure 22B**. La fraction II s'est révélée être la fraction porteuse de l'activité spécifique la plus élevée. C'est par conséquent cette fraction que nous avons utilisé pour la mise en place du système de réplication *in vitro* d'un fragment d'ADNmt. La réplication a ensuite été réalisée en présence d'une amorce marquée en 5' au P32 spécifique à la région 5' de la matrice ADN. Cette matrice correspond à un produit de PCR équivalant à l'ADNmt muté (deux bornes de la délétion de l'ADNmt) soit à l'ADNmt sauvage (une seule borne de la délétion située au niveau d'une région du gène du cytochrome B). La réplication sur la matrice simple ou double brin a été testée et c'est

A



B



**Figure 23: Effet des ARN recombinants sur la réplication in vitro de fragments d'ADNmt double brin.**

**A)** Autoradiographie de gels dénaturants représentant les produits complets de la synthèse in vitro de fragments d'ADNmt sauvage (WT) et muté (MT). La synthèse est réalisée en présence d'ARN (indiqué au dessus du gel) de concentration croissante (indiqué en dessous du gel).

**B)** Histogramme représentant l'efficacité relative de la réplication en % en fonction de la quantité de molécules d'ARN recombinant par molécule d'ADN. Les histogrammes verts correspondent à la matrice sauvage WT et les histogrammes roses à la matrice mutée MT.

cette dernière qui a permis la synthèse la plus efficace. L'effet des ARN recombinants sur la réplication a donc été évalué sur une matrice double brin.

### 3.2.2 Evaluation de l'effet des ARN recombinants

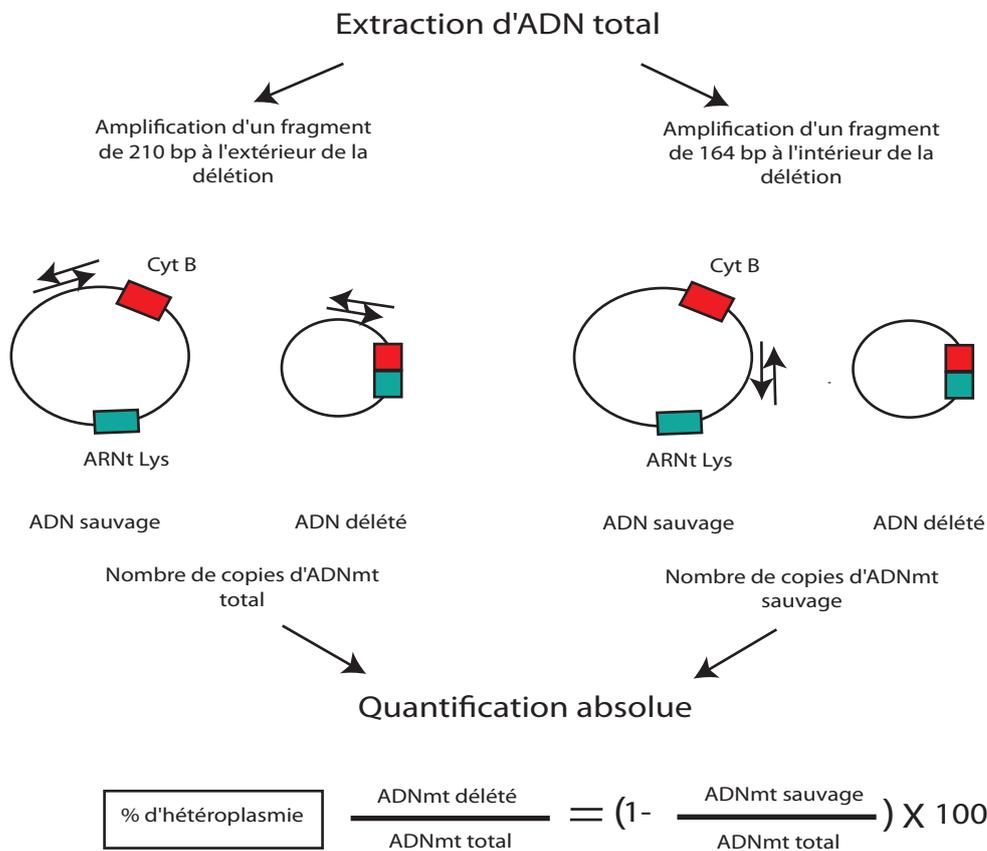
Une fois les paramètres du test de réplication optimisés, ce dernier a été effectué en présence des ARN recombinants. Les résultats obtenus montrent une diminution de synthèse de l'ADN (**Figure 23A**). Cette inhibition est dose-dépendante : une diminution des produits complets de la réplication des fragments d'ADN portant les deux bornes de la délétion a été observée en présence de concentrations croissantes d'ARN FD-H et FD-L. L'inhibition semble très efficace puisqu'une baisse de 40% des produits de la réplication est obtenue en présence de seulement 5 molécules d'ARN par molécule d'ADN. La meilleure inhibition, de l'ordre de 80%, a été observée pour un ratio de 50 molécules d'ARN par molécule d'ADN. Pour comparaison, ce pourcentage d'inhibition est le même que celui qui avait été reporté avec des PNA pour un excès molaire de 20. L'inhibition de la réplication est de plus spécifique puisqu'on n'observe qu'une très faible diminution de la réplication des fragments d'ADNmt sauvages, de l'ordre de 10% pour un ratio de 50 ARN par ADN (**Figure 23B**). A une trop forte concentration, il est en effet probable que l'ARN interfère également de façon non spécifique avec l'ADNmt sauvage.

Ces résultats démontrent donc que les deux ARN FD-L et FD-H sont non seulement capables d'inhiber la réplication d'un fragment d'ADN délété mais qu'ils sont des agents anti-réplicatifs tout aussi prometteurs que des oligonucléotides artificiels.

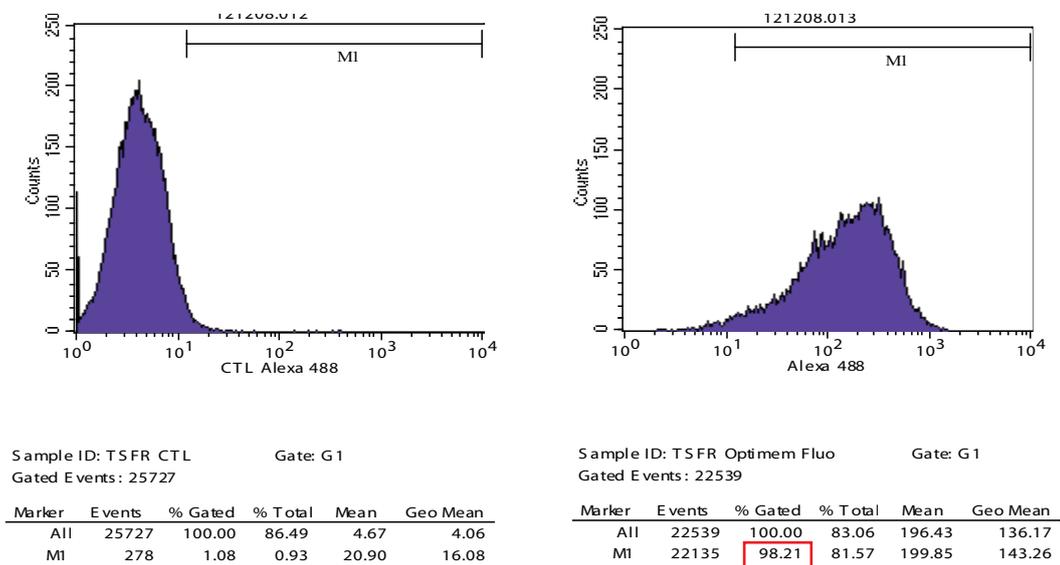
## 4 Evaluation *in vivo* du potentiel des ARN recombinants

### 4.1 Description des cellules utilisées

Une fois le potentiel des ARN anti-réplicatifs démontré *in vitro*, ils ont été testés *in vivo* dans un système de cellules cybrides en culture. Ces cellules, créées dans le laboratoire de A. Lombes (*CRICM, Paris*), résultent de la fusion de cytoplastes de fibroblastes du patient atteint du syndrome de Kearns-Sayre avec des cellules immortalisées d'osteosarcome143B rho<sup>0</sup> (cellules dépourvues d'ADN mitochondrial). L'ADN total de ces cellules a été extrait pour servir de matrice à l'amplification par PCR de la région entourant la délétion. Les produits de PCR ont ensuite été clonés dans le plasmide pUC119 et les différents clones



**Figure 24: Procédure expérimentale permettant la quantification du taux d'hétéroplasmie dans les cellules cybrides par PCR quantitative en temps réel.**



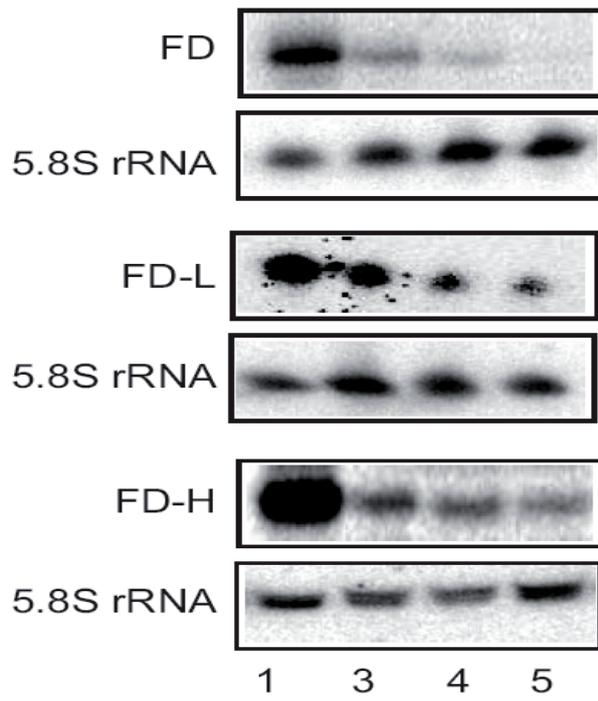
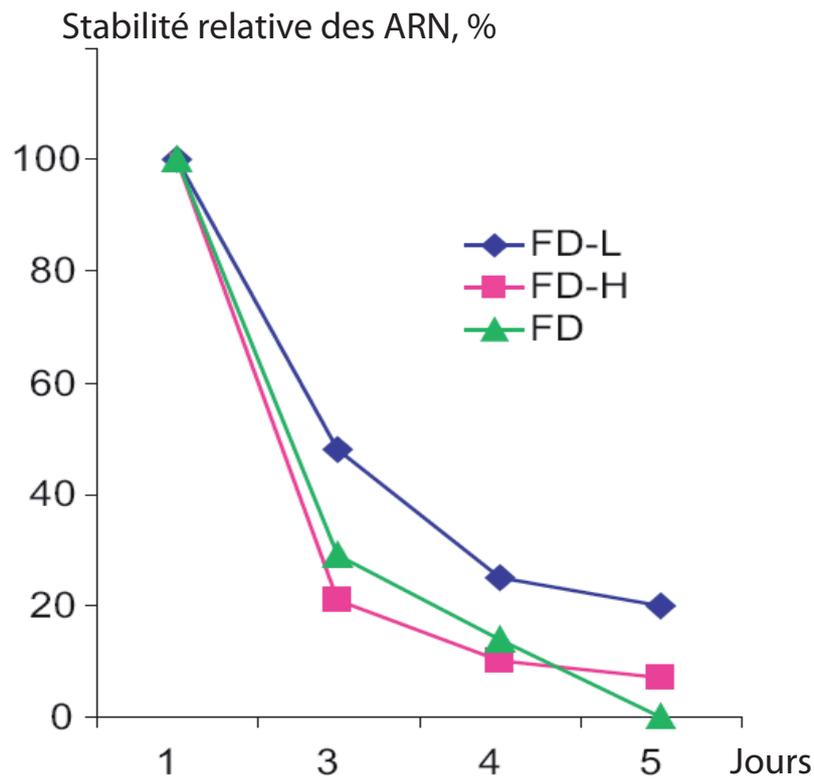
**Figure 25: Vérification du taux de transfection des cellules cybrides par FACS.**

L'axe des abscisses représente le nombre de cellules collectées et l'axe des ordonnées l'intensité de la fluorescence. Le panel de gauche correspond aux cellules transfectées par des ARN non fluorescents, et le panel de droite aux cellules transfectées avec l'ARN FD-L marqué par le fluorophore Alexa 488. Le carré rouge correspond aux pourcentage de cellules fluorescentes présentes dans la fenêtre M1 sélectionnée.

obtenus séquencés. Toutes les séquences correspondant aux bornes de la délétion se sont révélées identiques, montrant l'absence d'hétérogénéité dans cette région de l'ADNmt muté. Le taux d'hétéroplasmie dans les cellules a quant à lui été quantifié par la technique de la PCR quantitative en temps réel. Cette méthode présente de nombreux avantages par rapport à la technique d'hybridation sur Southern pouvant également être employée: ne nécessitant que très peu d'ADN, elle est sensible et très rapide dès lors que ses paramètres ont été optimisés. Le principe de la méthode est le suivant : un aliquot d'ADN total (nucléaire et mitochondrial) est extrait des cellules cybrides puis soumis à deux qPCR différentes. La première amplifie l'ADNmt total (sauvage et délété) grâce à un couple d'amorces amplifiant une zone du gène de l'ARNr 12S à l'extérieur de la délétion. La seconde qPCR n'amplifie que l'ADNmt sauvage grâce à un couple d'amorces présent cette fois-ci à l'intérieur de la délétion donc absent de l'ADNmt délété. Cette méthode permet d'obtenir, par comparaison à une gamme étalon aux concentrations en ADN connues, le nombre absolu de copies d'ADNmt total et sauvage contenus dans l'échantillon. Le ratio entre l'ADNmt muté et l'ADNmt total permet ensuite de déduire le taux d'hétéroplasmie de la cellule (**Figure 24**). La réalisation de qPCR différentes sur un même échantillon d'ADN total a permis d'estimer le taux d'hétéroplasmie des cellules cybrides à 65% avec une déviation standard de 2%. Ce taux reste stable au cours du temps, même après plusieurs mois de culture.

## 4.2 Transfection transitoire de cellules cybrides

Les cellules ont été directement transfectées par lipofection avec les ARN anti-réplicatifs produits *in vitro* par T7 transcription. Pour pouvoir observer un effet potentiel des ARN sur le taux d'hétéroplasmie, il est important que la majorité des cellules soient transfectées afin que l'effet ne soit pas masqué par la présence de cellules non transfectées. Dans ce but, les paramètres de la transfection ont dans un premier temps été optimisés en variant différentes conditions: niveau de confluence des cellules, concentration en ARN, ratio ARN/lipofectamine. Pour ce faire, les cellules ont été transfectées avec l'ARN FD-L transcrit en présence de nucléotides marqués par un fluorophore, puis analysées par FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting). Ces études préliminaires ont permis de trouver les conditions optimales de transfection des cellules cybrides permettant d'obtenir un taux de transfection supérieur à 90% (**Figure 25**). De plus aucune toxicité apparente des ARN et de la procédure de transfection n'a été observée sur les cellules.

**A****B**

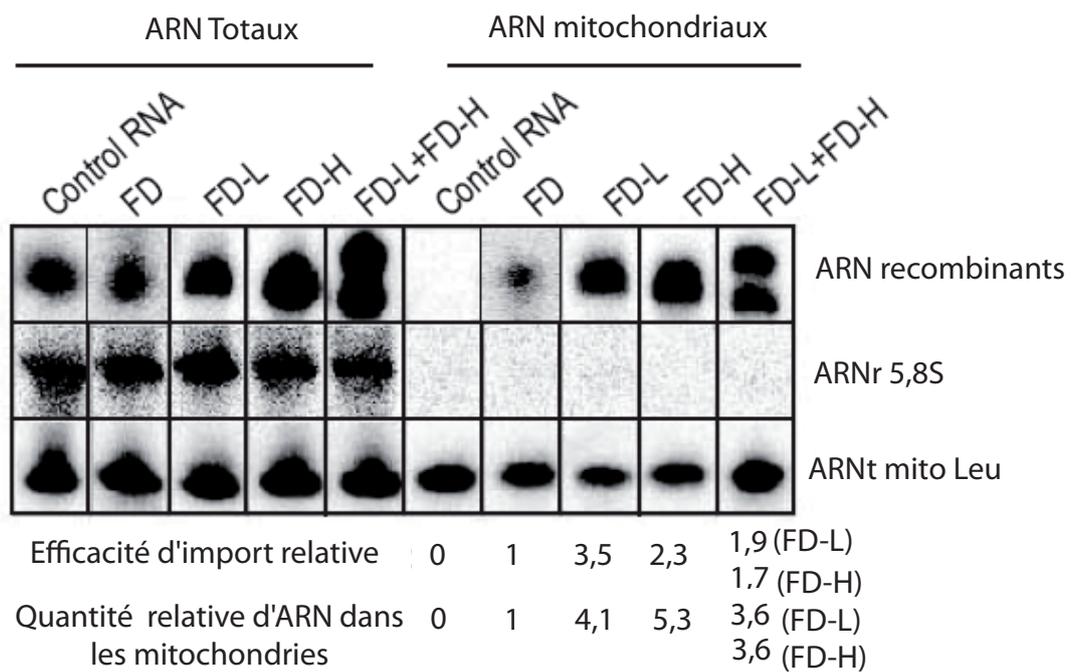
**Figure 26: Analyse de la stabilité des ARN F1D1, FD-L et FD-H dans les cellules cybrides transfectées transitoirement.**

**A)** Hybridation d'ARN total de cellules cybrides 1, 3, 4 et 5 jours après la transfection avec une sonde contre l'ARNr 5,8S et contre les ARN F1D1, FD-L et FD-H.

**B)** Graphique représentant les ARN F1D1, FD-L et FD-H présents dans les cellules cybrides 1, 3, 4 et 5 jours après la transfection.

### 4.3 Etude de la stabilité des ARN recombinants dans les cellules

Pour espérer avoir un effet des ARN anti-réplicatifs sur le taux d'hétéroplasmie il est important que ceux-ci perdurent un certain temps dans la cellule. Leur stabilité a été analysée de la façon suivante : après transfection , un aliquot de cellules a été prélevé toutes les 24h pendant 5 à 6 jours. Les ARN totaux ont été extraits, analysés par hybridation sur northern et la stabilité des ARN anti-réplicatifs évaluée en calculant pour chaque jour le ratio entre leur signal et celui d'un ARN cytosolique (**Figure 26**). Le référentiel de 100% correspond au jour 1 (24h après la transfection). Les résultats ont révélé que l'ARN F1D1 est détectable dans les cellules jusqu'à 4 jours après la transfection et les ARN FD-L et FD-H jusqu'à au moins 5 jours. L'ARN FD-L se révèle être le plus stable, suivi de l'ARN FD-H et enfin de l'ARN F1D1. Ces résultats sont surprenants à plus d'un titre. En effet, les ARN sont la cible potentielle de multiples RNases dans les cellules participant à leur maturation et à leur dégradation. Des données reportant le temps de demie-vie d'ARN directement intégrés dans les cellules par transfection sont difficiles à trouver dans la littérature. La majorité de ce type d'expériences réalisées ont été faites avec des ARN interférents ayant en général un temps de demie-vie s'exprimant en heures et non en jours. Leur structure et leur métabolisme dans les cellules sont toutefois différents des ARN recombinants étudiés ici. Outre la présence des deux hélices qui pourrait protéger ces derniers de l'action des exonucléases, il est possible que les ARN recombinants présents en grande quantité dans les cellules (signal supérieur à celui de l'ARNr 5,8S à J1) saturent le système de dégradation. Le mode de transfection des cellules par lipofection pourrait également jouer un rôle dans la stabilité des ARN (Barreau et al, 2006). Une partie de l'ARN pourrait être protégée par des vésicules de lipofectamine ne se disruptant pas immédiatement dans le cytoplasme ou dans des endosomes. Cela pourrait avoir deux conséquences : l'une négative si cela les empêche d'atteindre les mitochondries soit positive si les ARN sont relargués par la suite progressivement. On peut également imaginer que les ARN importés dans la mitochondrie y soient moins dégradés que dans le cytoplasme ou qu'ils y soient protégés du fait de leur hybridation avec l'ADNmt. Cela pourrait expliquer la légère différence de stabilité observée entre les ARN anti-réplicatifs FD L, FD H et l'ARN F1D1 qui lui ne s'hybride pas à l'ADNmt.



**Figure 27: Test d'importation des ARN recombinants dans les mitochondries des cellules cybrides.** Les fractions d'ARN totaux et mitochondriaux sont hybridés avec des sondes reconnaissant les ARN recombinants, l'ARNr 5,8S et l'ARNt mitochondrial Leucine (indiquées à droite du gel). Les efficacités d'import relatives et les quantités d'ARN présents dans les mitochondries relatives à l'ARN F1D1 sont indiquées en dessous du gel.

#### 4.4 Etude de l'importation des ARN recombinants dans les mitochondries

A ce jour la stratégie anti-génomique n'a pu être testée *in vivo* de par la difficulté d'adresser dans la mitochondrie des agents anti-réplicatifs artificiels. Le projet de ma thèse repose en grande partie sur la création d'un système permettant d'importer de tels agents.

L'analyse de l'importation des ARN recombinants dans les mitochondries des cellules cybrides a été réalisée selon la même méthodologie que celle utilisée au chapitre précédent pour le vecteur F1D1 (Chapitre I.2 des résultats). Deux jours après la transfection des cellules les mitochondries ont été isolées et les ARN mitochondriaux analysés par northern blot.

Les résultats démontrent que les ARN FD-L et FD-H sont importés dans la mitochondrie. En effet ils sont tous les deux retrouvés dans la fraction d'ARN mitochondriale considérée comme pure puisque dépourvue de contaminants cytosoliques (**Figure 27**). Pour écarter l'hypothèse que leur présence dans la fraction mitochondriale pourrait être due au fait qu'ils soient plus petits et en surnombre par rapport aux ARN endogènes donc moins dégradés par les RNases, un ARN artificiel de même taille a été construit (**Figure 28**). Cet ARN, dont la séquence et la structure diffèrent de celles des ARN anti-réplicatifs, ne contenant donc théoriquement aucun déterminant d'import, n'est pas retrouvé dans la fraction mitochondriale. Ces résultats permettent de conclure que l'ARN F1D1 peut servir de vecteur pour importer dans la mitochondrie des oligonucléotides au potentiel anti-génomique. L'ajout d'un insert entre les deux hélices D et F de l'ARN F1D1 n'inhibant pas l'import on peut supposer que la structure des ARN anti-réplicatifs prédite par M-Fold est la bonne, permettant de garder intactes les déterminants d'import que sont l'hélice D et l'hélice F.

L'efficacité d'importation des ARN recombinants et leur quantité dans les mitochondries ont été calculées et comparées à l'ARN F1D1. On remarque que le signal de l'ARNt<sup>Leu</sup> mitochondrial est plus faible dans la fraction mitochondriale que dans la fraction d'ARN total. En théorie, ceci devrait être l'inverse étant donné que les ARN totaux déposés sur gel ont été extraits de 10% des cellules transfectées alors que les ARN mitochondriaux déposés correspondent à 90% des cellules. Toutefois, seul un vingtième des ARN mitochondriaux de départ sont visibles sur northern blot, signifiant par conséquent que 95% des ARN mitochondriaux endogènes ont été perdu lors de leur purification. Un « smear » d'ARN mitochondriaux dégradés est ainsi souvent observé sous la bande correspondant à la

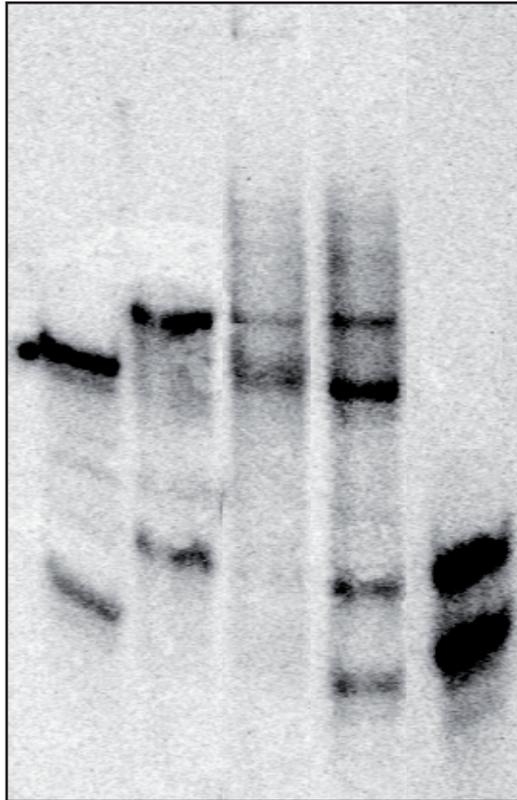


taille de l'ARNt mitochondrial hybridé, ce qui n'est jamais observé dans le cas des ARN recombinants. Ces derniers semblent donc plus stables à la procédure de purification des mitochondries que les ARN endogènes. Toutefois, en estimant que la stabilité de chaque ARN recombinant est équivalente et qu'il en est de même pour les ARNmt endogènes, on peut comparer l'efficacité d'import relative des ARN recombinants. Les résultats montrent que les ARN FD-L et FD-H sont importés de façon plus efficace que le vecteur F1D1, ce qui laisse supposer que l'insert entre les deux hélices pourrait permettre une conformation tridimensionnelle plus facilement reconnaissable par les facteurs d'import protéiques ou par les récepteurs de la membrane mitochondriale externe.

Malgré l'incertitude sur la quantité absolue d'ARN recombinant présent dans la mitochondrie, il est possible d'estimer approximativement la quantité d'ARN recombinant par molécule d'ADNmt. Le nombre de cellules transfectées avec l'ARN FD-H a été compté avec précision avant l'expérience et est égal à environ  $3,7 \cdot 10^7$  cellules. Le nombre de molécules d'ADNmt a été évalué par qPCR et correspond à environ  $1000 \pm 50$  molécules d'ADNmt par cellule. Le nombre total de molécules d'ADNmt est donc de  $3,7 \cdot 10^{10}$ . Le signal obtenu pour l'ARN FD-H dans la fraction d'ARN mitochondriaux a été comparé à celui d'un ARN dont la quantité avant dépôt était connue. La quantité d'ARN FD-H dans la fraction mitochondriale est ici de 33ng, ce qui équivaut à  $1,17 \cdot 10^{12}$  molécules d'ARN. On peut en conclure que le nombre de molécules d'ARN FD-H par molécule d'ADNmt est d'environ 30. Ceci serait vrai si le signal obtenu pour FD-H dans la fraction d'ARN mitochondriaux correspondait à la totalité de l'ARN présent dans les mitochondries purifiées. Si ce signal correspond à 1/20<sup>e</sup> de l'ARN FD-H présent dans les mitochondries au départ, la quantité totale d'ARN FD-H dans les mitochondries serait alors de 660ng et on aboutirait à 635 molécule d'ARN recombinant par molécule d'ADNmt. Bien que ces calculs nécessitent l'introduction de plusieurs approximations, il semblerait donc qu'il soit possible d'avoir au minimum 30 molécules d'ARN recombinant par molécule d'ADNmt. En conclusion, le ratio de 50 molécules d'ARN par molécule d'ADNmt utilisé dans le test de répllication *in vitro* pourrait donc être atteint dans les cellules en culture.

Les cellules ont également été transfectées avec les deux ARN FD-L et FD-H en même temps. Ces ARN étant complémentaires sur 15 bases (avec un mésappariement correspondant à la 17<sup>e</sup> base de l'insert de FD-L), la possibilité qu'ils puissent former un duplex, et auquel cas potentiellement inhiber leur importation est envisageable. Leur importation semble montrer que ce n'est pas le cas et leur efficacité d'import similaire indique

1 2 3 4 5



**Figure 29: Analyse du profil de migration des ARN recombinants sur gel natif.**

Avant dépôt sur gel, les ARN FD-L et FD-H sont incubés dans le milieu de transfection. Les ARN sont détectés par hybridation avec une sonde contre les ARN FD-H et FD-L.

Piste 1: ARN FD-L incubé seul

Piste 2: ARN FD-H incubé seul

Piste 3: ARN FD-L et FD-H incubés ensemble en présence de lipofectamine

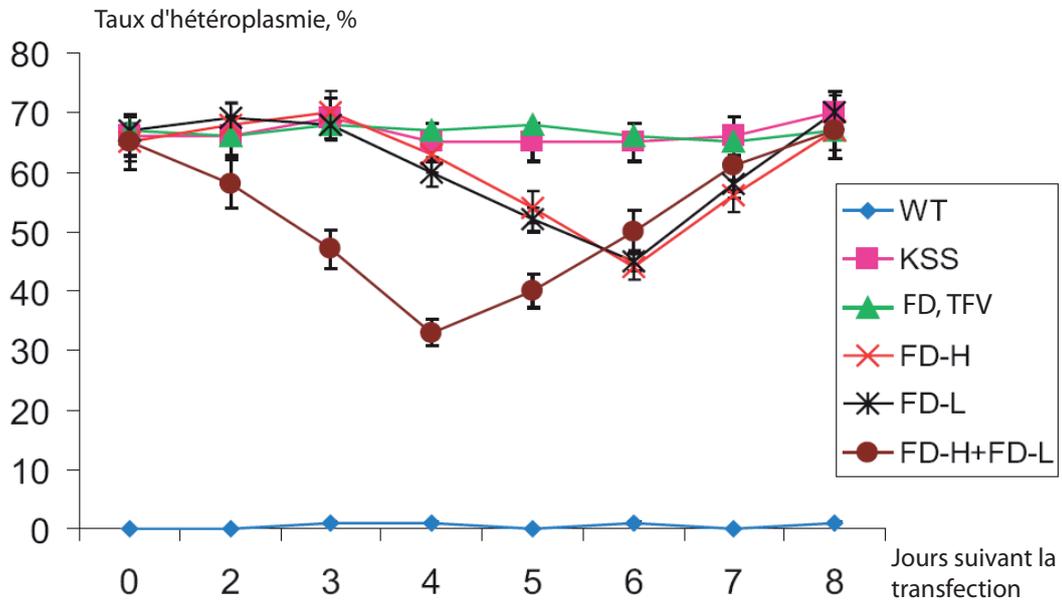
Piste 4: ARN FD-L et FD-H incubés ensemble sans lipofectamine

Piste 5: ARN FD-L et FD-H chauffés à 95°C avant dépôt

que l'import d'aucun des deux ARN n'est privilégié. L'analyse de leur conformation sur gel natif au moment de leur incubation dans le milieu de transfection semble également démontrer qu'ils ne s'hybrident pas entre eux au moment de la transfection (**Figure 29**). En piste 1 et 2 sont représentés les ARN recombinants incubés seuls dans le milieu de transfection. Deux bandes sont observées pour chaque ARN. La bande la plus haute pourrait correspondre à l'ARN replié dans sa structure native tandis que la bande la plus basse pourrait correspondre à une structure dépliée de l'ARN. Cette dernière hypothèse est renforcée par la piste 5 représentant les ARN chauffés à 90°C et directement déposés sur gel, et dont le niveau de migration correspond aux bandes les plus basses des pistes 1 et 2. Les pistes 3 et 4 correspondent aux ARN incubés ensemble avec ou sans lipofectamine. Aucune nouvelle bande n'étant apparue, il semblerait que les deux ARN recombinants ne forment pas de duplex, du moins dans le milieu de transfection. Il est également intéressant de noter que les bandes les plus basses disparaissent lorsque les ARN sont incubés avec la lipofectamine, laissant supposer que les liposomes facilitent le repliement des ARN dans leur conformation native. L'importation simultanée des ARN FD-H et FD-L offre la possibilité de transférer les cellules avec des ARN capables de cibler à la fois le brin H et le brin L de l'ADNmt, ce qui pourrait s'avérer une option utile pour la stratégie antigénomique.

#### **4.5 Etude de l'effet des ARN recombinants sur le taux d'hétéroplasmie**

En démontrant l'importabilité des ARN recombinants dans les mitochondrie des cellules cybrides, un obstacle de taille dans la mise en œuvre de la méthode anti-génomique a été franchi. Toutefois, si ces ARN semblent prometteurs *in vitro*, de nombreux autres obstacles pourraient entraver leur action *in vivo* : l'accessibilité à l'ADNmt, le ciblage de la zone d'hybridation, leur déplacement par les machineries de réplication et de transcription... Pour évaluer leur effet, nous avons quantifié le taux d'ADNmt muté par rapport au taux d'ADNmt sauvage par la méthode de la qPCR comme décrit dans le paragraphe II.4.1 des résultats. L'ADN total est extrait d'un aliquot de cellules prélevées toutes les 24h après leur transfection avec les ARN anti-réplicatifs et ce sur une période de 10 jours. Pour chaque transfection, un minimum de trois expériences indépendantes ont été réalisées.

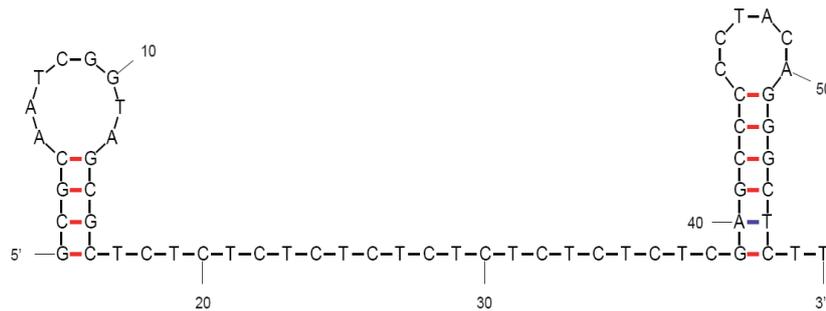


**Figure 30 : Quantification du taux d'hétéroplasmie présent dans les cellules différents jours après leur transfection par les ARN.**

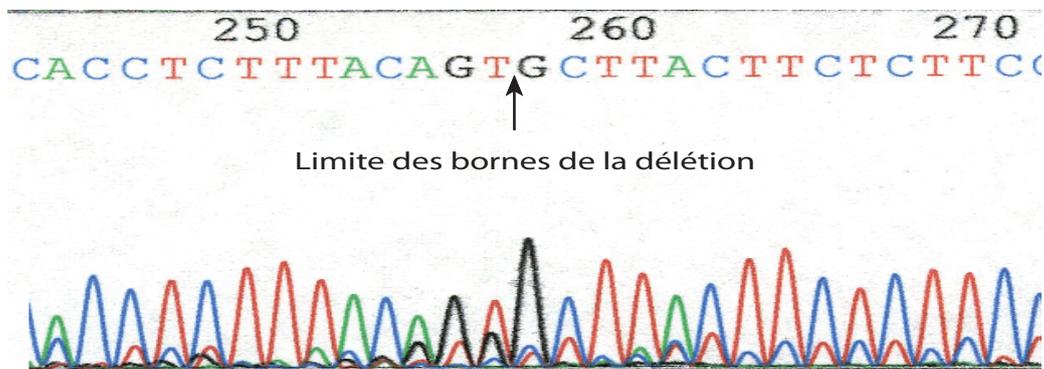
WT: cellules 143B contenant 100% d'ADN sauvage

KSS: cellules cybrides non transfectées

FD, TFV, FD-H, FD-L: cellules cybrides transfectées respectivement par l'ARN F1D1, TFV, FD-H et FD-L.



**Figure 31: Structure secondaire de l'ARN TFV prédite par MFold.**



**Figure 32: Vérification de l'homogénéité de séquence des bornes de la délétion par séquençage.**

Aucun effet sur le taux d'hétéroplasmie n'est observé lorsque les cellules sont transfectées avec l'ARN F1D1 n'ayant pas d'insert anti-répliatif mais également avec un ARN contenant un insert de 22 bases ne s'hybridant pas à l'ADNmt (**Figure 31**). La transfection des cellules cybrides avec les ARN soit FD-L soit FD-H a quant à elle conduit à une baisse du taux d'hétéroplasmie de l'ordre de 20%, six jours après la transfection. La baisse débute le 4<sup>e</sup> jours et revient à son stade initial 8 jours après la transfection (**Figure 30**).

La stratégie anti-génomique avait été initialement conçue en se basant sur le ciblage du brin H, qui, selon le mode de réplication non synchronisé, resterait simple brin pendant les 2 tiers de la réplication. Nos résultats semblent indiquer que les deux brins de l'ADNmt peuvent être ciblés avec le même résultat sur le taux d'hétéroplasmie puisque qu'une baisse similaire est observée avec les ARN FD-L et FD-H. Partant de ce constat, les cellules ont ensuite été transfectées par les deux ARN à la fois. Cette stratégie s'est révélée payante permettant d'obtenir une baisse du taux d'hétéroplasmie plus accentuée de l'ordre de 35%. Le changement d'hétéroplasmie est de plus observé sur un laps de temps plus long avec une baisse maximum dès le 4<sup>e</sup> jour.

Malgré ces résultats positifs, un retour du taux d'hétéroplasmie à son niveau initial de 65% est observé que les cellules soient transfectées avec un ou deux ARN à la fois. Il pourrait être possible que l'arrêt de la fourche de réplication induit ici par la présence des ARN recombinants pourrait conduire à la formation de nouvelles délétions comme cela a été démontré dans des études analysant l'impact de mutations dans les enzymes Twinkle et POLG (Goffart et al, 2009; Tynismaa et al, 2005). De même la réplication d'une sous population d'ADNmt porteur d'un autre type de délétion soit favorisée au même titre que la réplication de l'ADNmt sauvage. Pour vérifier si de nouvelles délétions sont apparues après le traitement des cellules par les ARN recombinants, une PCR sur un extrait d'ADN total a été réalisée, amplifiant la région de la délétion de l'ADNmt provenant du jour de la transfection, du jour où l'hétéroplasmie est la plus basse et du jour suivant la remontée de l'hétéroplasmie à son niveau initial. Ces produits de PCR ont ensuite été séquencés mais aucune hétérogénéité de séquence n'a pu être observée. Un exemple de séquence est représenté en **figure 32**.

Pour conclure, l'ensemble de ces résultats démontrent pour la première fois qu'il est possible d'obtenir un shift d'hétéroplasmie dans des cellules en culture en adressant dans la mitochondrie des agents potentiellement capables d'interférer avec la réplication de l'ADNmt muté.



## 5 Article n°2

**Mitochondrial targeting of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic pathogenic mutation in human mitochondrial DNA associated with Kearns-Sayre Syndrome.** Caroline Comte, Anne-Marie Heckel-Mager, Abdeljalil Boucheham, Alexandre Smirnov, Anne Lombès, Robert P. Martin, Nina Entelis, Ivan Tarassov  
En cours de soumission



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

Caroline Comte<sup>1</sup>, Anne-Marie Heckel-Mager<sup>1</sup>, Abdeldjalil Boucheham<sup>1</sup>, Alexandre Smirnov<sup>1</sup>, Karine Auré<sup>2#</sup>, Anne Lombès<sup>2</sup>, Robert P. Martin<sup>1</sup>, Nina Entelis<sup>1\*</sup>, Ivan Tarassov<sup>1\*</sup>

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

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

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

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

Total words count: 3497  
Abstract words count: 127  
References & notes: 29

## ABSTRACT

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

## INTRODUCTION

Mitochondria are responsible for many cellular processes ranging from respiration to apoptosis and their dysfunctions have severe consequences. More than 200 human neuromuscular incurable diseases were associated with mtDNA mutations (1). One of the striking particularities of the majority of these pathologies is the simultaneous presence of mutant and wild-type mitochondrial genomes in the same cell, the heteroplasmy (2). Two approaches were proposed to address mtDNA-associated pathologies by gene therapy. In some cases, defects may be rescued by targeting into mitochondria nuclear DNA-expressed counterparts of the affected molecules, approach called *allotopic* strategy (3-5). Reducing the level of heteroplasmy, *antigenomic* strategy, is another possibility. To this last goal, several approaches were tested, as mitochondrial targeting of restriction endonucleases cleaving mutated mtDNA (6, 7), or specifically designed PNA molecules inhibiting their replication (8, 9). The first approach is however limited by rare occurrence of mutations creating restriction sites, while the second - by the difficulty to deliver PNAs into mitochondrial matrix *in vivo* (10).

We have exploited RNA mitochondrial import pathway to target into human mitochondria RNAs able to hybridize with the mutated mtDNA and to inhibit selectively its replication. Import of nuclear DNA-encoded RNAs into mitochondria is a widely spread phenomenon, however the types, number of imported RNAs and targeting mechanisms vary among species (11). Mammalian mitochondria were reported to import several types of small non-coding RNAs, including some tRNAs (in natural or artificial manner) (12, 13), RNA components of RNase P and MRP endonuclease (14, 15) and 5S rRNA (16-18). Previously, we demonstrated that 5S rRNA import mechanism can rely on protein import factors (one of which recently identified as the mitochondrial enzyme rhodanese (19)), interacting with two

structural motifs of the 5S rRNA molecule, while the third one, so called  $\beta$ -domain, may be either deleted or replaced without loss of import capacity (20). Additionally, analysis of artificial import of yeast tRNAs derivatives into human mitochondria (16) permitted us to design short synthetic RNAs (referred to as FD-RNA) comprising two domains of the tRNA and characterized by a high efficiency of mitochondrial import (21). Here we show that these two types of molecules can serve as vectors to deliver into mitochondria oligoribonucleotides with a therapeutic potential.

## RESULTS AND DISCUSSION

To assay the antigenomic strategy we used as a model mtDNA containing a large deletion (nucleotides 8363-15438) underlying a case of a frequent mitochondrial pathology, the Kearns Sayre Syndrome (KSS) (**Fig.1A**). Deletion in mtDNA generates a new sequence at the fusion of the deletion boundaries, referred to as KSS-DNA, which could serve as the target for the antigenomic RNAs. To use the 5S rRNA and FD-RNA as mitochondrial vectors, the distal portion of the  $\beta$ -domain of 5S rRNA (**Fig.1B**) and the linker part between hairpin domains in FD-RNA (**Fig.1C**) were replaced by sequences complementary to either H- or L-strand of KSS-DNA (referred to as RNA-H or RNA-L). The choice of the insert length was driven by secondary structure and melting temperature analysis, to avoid alternative structures affecting import, and to allow specific hybridization with the target DNA under physiological conditions (**Fig. 2A**). All the recombinant RNAs were importable into isolated human mitochondria, as shown by *in vitro* import assay (16) (supplementary **Fig. S1**).

To test if recombinant RNAs imported into mitochondria interfere with replication of the mutant mtDNA, an *in vitro* replication assay was first established (**Fig.2B**). It comprised PCR-amplified mtDNA fragments containing wild-type mtDNA or KSS-mtDNA sequences,

[<sup>32</sup>P]-5'-labeled primers and mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$ , partially purified from beef liver as described elsewhere (22). This assay permitted to replicate both strands of mtDNA fragments with a similar efficiency, both on a single- or double-stranded templates. It was observed that addition of recombinant RNAs containing KSS-DNA-H or KSS-DNA-L inserts inhibited replication of KSS-DNA in a dose-dependent manner (**Fig 2C**). A decrease of mutated mtDNA replication by 20-40% was observed at the 5:1 RNA:DNA ratio, and by 60-80% - at 50:1 ratio. These values are similar to those observed previously for PNA (8), which indicates that RNAs are as efficient as PNAs. In contrast, the presence of the recombinant RNAs did not significantly inhibit replication of wild-type mtDNA, suggesting that recombinant RNAs can discriminate KSS-DNA from the wild-type one.

To validate this anti-replication effect *in vivo*, we constructed a *transmitochondrial* cybrid cell line containing the 8363-15438 deletion. The cybrid cells were characterized by a stable presence of 65±2% of mutation upon more than 5 months of continuous cultivation (supplementary **Fig. S2**). As a first assay, transient transfection of KSS cells with FD-L and FD-H RNAs was performed. Recombinant RNAs were detectable in cybrid cells up to 5 days after transfection (**Fig. 3A**) and were even more efficiently imported into mitochondria than FD-RNA without insert (**Fig. 3B**), which could be explained by an increased flexibility of the molecules with longer linkers between the two structured motifs. Heteroplasmy levels were measured at different time points spanning the 10-days period after transfection (**Fig. 3C**). We observed a decrease of the proportion of mutant mtDNA by 15-25% in cells transfected by recombinant RNAs containing either KSS-DNA-H or KSS-DNA-L inserts, but not in mock-transfected ones or cells transfected with FD-RNA. The most pronounced decrease (by 35±2%) was observed when two RNAs, FD-L and FD-H, containing inserts complementary to both mtDNA strands, were present inside the mitochondria simultaneously (**Fig. 3B, C**). The shift of heteroplasmy was reproducibly observed with a 3-6 days delay in respect to the

transfection indicating that mitochondrially imported RNAs can function as anti-replicative agents in human cells. However, the initial level of heteroplasmy was consistently restored within 7-8 days, the temporal character of the effect possibly being a consequence of the recombinant RNAs degradation.

To investigate if it would be possible to stabilize the effect of imported RNAs on heteroplasmy levels, we generated stable KSS cell lines expressing recombinant 5S rRNAs, 5S-KSS-L and 5S-KSS-H (see **Fig. 1B**). About 30 individual clones of each series - containing either the empty vector, wild-type or recombinant 5S rRNA genes - were analyzed. All clones were characterized by a similar growth rate, suggesting the absence of toxic effect of transgenic RNAs. Control lines (mock-transfection, transfection with the empty vector or with the vector containing the wild-type 5S rRNA gene) generated clones with little variations of heteroplasmy, but for cells transfected with 5S-L and 5S-H RNA genes the occurrence of clones with decreased proportion of mutant mtDNA was observed (**Fig. 3D**). The lower heteroplasmy levels found in these clones were stable during 3 months of continuous cultivation. Expression and mitochondrial import of the recombinant 5S rRNAs in these clones was confirmed by RT-PCR analysis (**Fig. 3E**). Therefore, stable expression and mitochondrial import of the recombinant 5S rRNAs led to a stabilization of the curative effect (**Fig. 3F**). In agreement with the transient transfection results, simultaneous expression and mitochondrial targeting of both 5S-L and 5S-H RNAs led to the most pronounced shift of the heteroplasmy, that is to  $30\pm 2\%$  of mutated mtDNA molecules comparing to the initial level ( $65\pm 2\%$ ) (**Fig. 3F, G**).

Described approach of RNA-induced specific modulation of heteroplasmy levels may have both fundamental and applied interest. Indeed, the mechanism of human mtDNA replication is a subject of intense debate (23). The idea of anti-replicative heteroplasmy shift as a therapeutic approach (8) was initially based on the strand-displacement mtDNA

replication model that revealed long single-stranded replication intermediates (24). More recently, the strand-coupled model involving RNA-DNA hybrid intermediates was proposed (25, 26). Our data show that the oligoribonucleotides complementary to the both mtDNA strands can influence the replication, indicating the comparable accessibility of the both strands to hybridization with short RNAs. Thus, our approach may become an interesting tool to further study mtDNA replication mechanisms. Moreover, we demonstrate here for the first time that the replication of mitochondrial DNA containing a known pathogenic mutation may be specifically affected by RNA molecules containing oligonucleotide stretches complementary to the mutant region and that these molecules may be targeted into human mitochondria using artificially engineered RNAs based on 5S rRNA or tRNA as vectors. Although the inhibitory effect was partial (15-35% decrease of mutated mtDNA level), it may have a long term therapeutic interest, since only high levels of mutations in human mtDNA become pathogenic. Assays described here validate the antigenomic RNA-import strategy in cultured hybrid cells, being an obligatory first step to develop an efficient therapy.

## **METHODS**

***Clinical case and cell line construction.*** Patient T was diagnosed with a Kearns Sayre Shy syndrome. Clinical, biochemical and molecular analysis of the case are presented in details in supplementary online material. Sequencing of the mtDNA showed the deletion spanned from nucleotide 8363 to 15438 (see **Fig. 1A**). Cultured skin fibroblasts derived from the patient's skin biopsy were enucleated and fused to a human rho0 osteosarcoma cell line (143B), and cloned by limit dilution as reported (27). Selected clone had the mtDNA deletion, involving 65% mtDNA molecules. The stability of the heteroplasmy level and the homogeneity of the mutation was checked by qPCR and direct sequencing, respectively.

**Plasmids and recombinant RNAs.** For *in vitro* replication, two human mtDNA fragments were cloned in pUC119, 15251-15680, 430bp fragment, called WT-DNA and 8099-8365 / 15438-15680 512bp fragment comprising the fusion of the two boundaries of the KSS deletion, called KSS-DNA . All recombinant RNAs (5S rRNA versions and FD-RNAs) genes were cloned into pUC119 as described in (16, 20, 21), using primers listed in the Table S1. Recombinant RNA were obtained by T7 transcription. For *in vivo* expression, 5S rRNA gene versions were cloned in either pBK-CMV vector (Stratagene) or in pcDNA3neo/zeo vectors (Invitrogen), as described (20). To design secondary structures of recombinant RNAs, the *Mfold* program was used. Specific hybridization with target mtDNA was experimentally tested using Southern-blot hybridization of wild type and KSS replication templates with <sup>32</sup>P-labeled recombinant RNAs under physiological conditions.

**Manipulation with mitochondria.** Mitochondria from beef liver, cultured HepG2 or cybrid KSS cells were isolated as described in (28). The integrity of mitochondria was checked by a citrate synthase assay. To import [<sup>32</sup>P]-labeled RNAs in isolated mitochondria, we used the assay described earlier (16, 20). Partial purification of beef liver mitochondrial DNA polymerase was performed as described in (22, 29).

**In vitro replication.** Double-stranded replication template were prepared by PCR on the cloned mtDNA-fragments, called WT-DNA and KSS-DNA. Single stranded templates were generated with biotinylated primers as described in (8). Replication assay was done as described elsewhere (29). Addition of recombinant RNAs in the assay resulted in decreasing of the amount of the full-length replication product and in appearance of additional products of abortive replication (as in (8)). Since the abortive products were heterogeneous and

correlated with the amount of the full-length ones, we calculated the inhibitory effect taking into account only the last ones.

***Transient and stable transfection of cybrid cells.*** Transient transfection with synthetic RNAs was performed as described (20). It lead neither to any detectable decrease of viability, nor to significant change of the mtDNA cell content. Stable transfection were performed with Lipofectamin-2000. Selection (G418 or Zeocine) was applied after 48 h. Cloning was performed by serial dilution.

***Analysis of RNA import in vivo.*** Total and mitochondrial RNAs were isolated with TRIZol reagent (Invitrogen). Expression and mitochondrial import of recombinant 5S RNAs were detected by RT-PCR with primers listed in Table S1. Stability and mitochondrial import of FD-RNAs were analysed by Northern hybridisation with oligonucleotide probes against the recombinant RNAs or against control cytosolic and mitochondrial RNAs as described in (20, 28) (for probes, see Table S1). Import efficiency was estimated after quantification in Typhoon-Trio scanner as a ratio between the signal obtained after hybridization with FD probe and that with that complementary to mitochondrial tRNA<sup>Leu</sup> in the mitochondrial RNA preparation, as described previously (20). To compare import efficiencies of different RNAs, total level of each RNA in transfected cells was also taken into account and normalized.

***mtDNA analysis.*** Heteroplasmy was analysed by qPCR on total cellular DNA with primers listed in the Table S1. Two pairs of primers were used - for the 12S rRNA region not touched by the KSS deletion (nucleotides 109-1714) detecting all mtDNA molecules, and for the deleted region (nucleotides 10739-11839) detecting wild type mtDNA. In each case of qPCR,

the absolute amounts of the product were determined, by using in parallel the serial dilutions of known amounts of corresponding plasmid DNA.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors are grateful to E. Shoubridge, Montreal Institute of Neurology, for providing the rho0 143B cell line. This work was supported by CNRS (Centre National de Recherche Scientifique), University of Strasbourg, AFM (Association Française contre les Myopathies), ANR (Agence Nationale de la Recherche) and FRM (Fondation pour la Recherche Médicale).

## **REFERENCES**

1. MITOMAP. 2009. A Human Mitochondrial Genome Database. <http://www.mitomap.org>.
2. Wallace, D.C. 1999. Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* 283:1482-1488.
3. Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Mireau, H., Fox, T.D., Martin, R.P., and Tarassov, I.A. 2000. Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science* 289:1931-1933.
4. Mahata, B., Mukherjee, S., Mishra, S., Bandyopadhyay, A., and Adhya, S. 2006. Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells. *Science* 314:471-474.
5. Manfredi, G., Fu, J., Ojaimi, J., Sadlock, J.E., Kwong, J.Q., Guy, J., and Schon, E.A. 2002. Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus. *Nat Genet* 30:394-399.

6. Bacman, S.R., Williams, S.L., Garcia, S., and Moraes, C.T. 2010. Organ-specific shifts in mtDNA heteroplasmy following systemic delivery of a mitochondria-targeted restriction endonuclease. *Gene Ther* 17:713-720.
7. Bacman, S.R., Williams, S.L., Hernandez, D., and Moraes, C.T. 2007. Modulating mtDNA heteroplasmy by mitochondria-targeted restriction endonucleases in a 'differential multiple cleavage-site' model. *Gene Ther* 14:1309-1318.
8. Taylor, R.W., Chinnery, P.F., Turnbull, D.M., and Lightowers, R.N. 1997. Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication in vitro by peptide nucleic acids. *Nat Genet* 15:212-215.
9. Chinnery, P.F., Taylor, R.W., Diekert, K., Lill, R., Turnbull, D.M., and Lightowers, R.N. 1999. Peptide nucleic acid delivery to human mitochondria. *Gene Ther* 6:1919-1928.
10. Muratovska, A., Lightowers, R.N., Taylor, R.W., Turnbull, D.M., Smith, R.A., Wilce, J.A., Martin, S.W., and Murphy, M.P. 2001. Targeting peptide nucleic acid (PNA) oligomers to mitochondria within cells by conjugation to lipophilic cations: implications for mitochondrial DNA replication, expression and disease. *Nucleic Acids Res* 29:1852-1863.
11. Salinas, T., Duchene, A.M., and Marechal-Drouard, L. 2008. Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends Biochem Sci* 33:320-329.
12. Kolesnikova, O.A., Entelis, N.S., Jacquin-Becker, C., Goltzene, F., Chrzanowska-Lightowers, Z.M., Lightowers, R.N., Martin, R.P., and Tarassov, I. 2004. Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum Mol Genet* 13:2519-2534.

13. 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 U S A* 105:9186-9191.
14. 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.
15. 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.
16. 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.
17. 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.
18. Yoshionari, S., Koike, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Ueda, T., Miura, K., and Watanabe, K. 1994. Existence of nuclear-encoded 5S-rRNA in bovine mitochondria. *FEBS Lett* 338:137-142.
19. 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.
20. 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.

21. 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.
22. Wong, T.W., and Clayton, D.A. 1985. Isolation and characterization of a DNA primase from human mitochondria. *J Biol Chem* 260:11530-11535.
23. Holt, I.J. 2009. Mitochondrial DNA replication and repair: all a flap. *Trends Biochem Sci* 34:358-365.
24. Clayton, D.A. 1982. Replication of animal mitochondrial DNA. *Cell* 28:693-705.
25. Yasukawa, T., Reyes, A., Cluett, T.J., Yang, M.Y., Bowmaker, M., Jacobs, H.T., and Holt, I.J. 2006. Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *Embo J* 25:5358-5371.
26. Pohjoismaki, J.L., Holmes, J.B., Wood, S.R., Yang, M.Y., Yasukawa, T., Reyes, A., Bailey, L.J., Cluett, T.J., Goffart, S., Willcox, S., et al. 2010. Mammalian Mitochondrial DNA Replication Intermediates Are Essentially Duplex but Contain Extensive Tracts of RNA/DNA Hybrid. *J Mol Biol* 397:1144-1155.
27. King, M.P., and Attardi, G. 1989. Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* 246:500-503.
28. Mager-Heckel, A.M., Entelis, N., Brandina, I., Kamenski, P., Krashennnikov, I.A., Martin, R.P., and Tarassov, I. 2007. The analysis of tRNA import into mammalian mitochondria. *Methods Mol Biol* 372:235-253.
29. Wong, T.W., and Clayton, D.A. 1985. In vitro replication of human mitochondrial DNA: accurate initiation at the origin of light-strand synthesis. *Cell* 42:951-958.

## Legends to figures

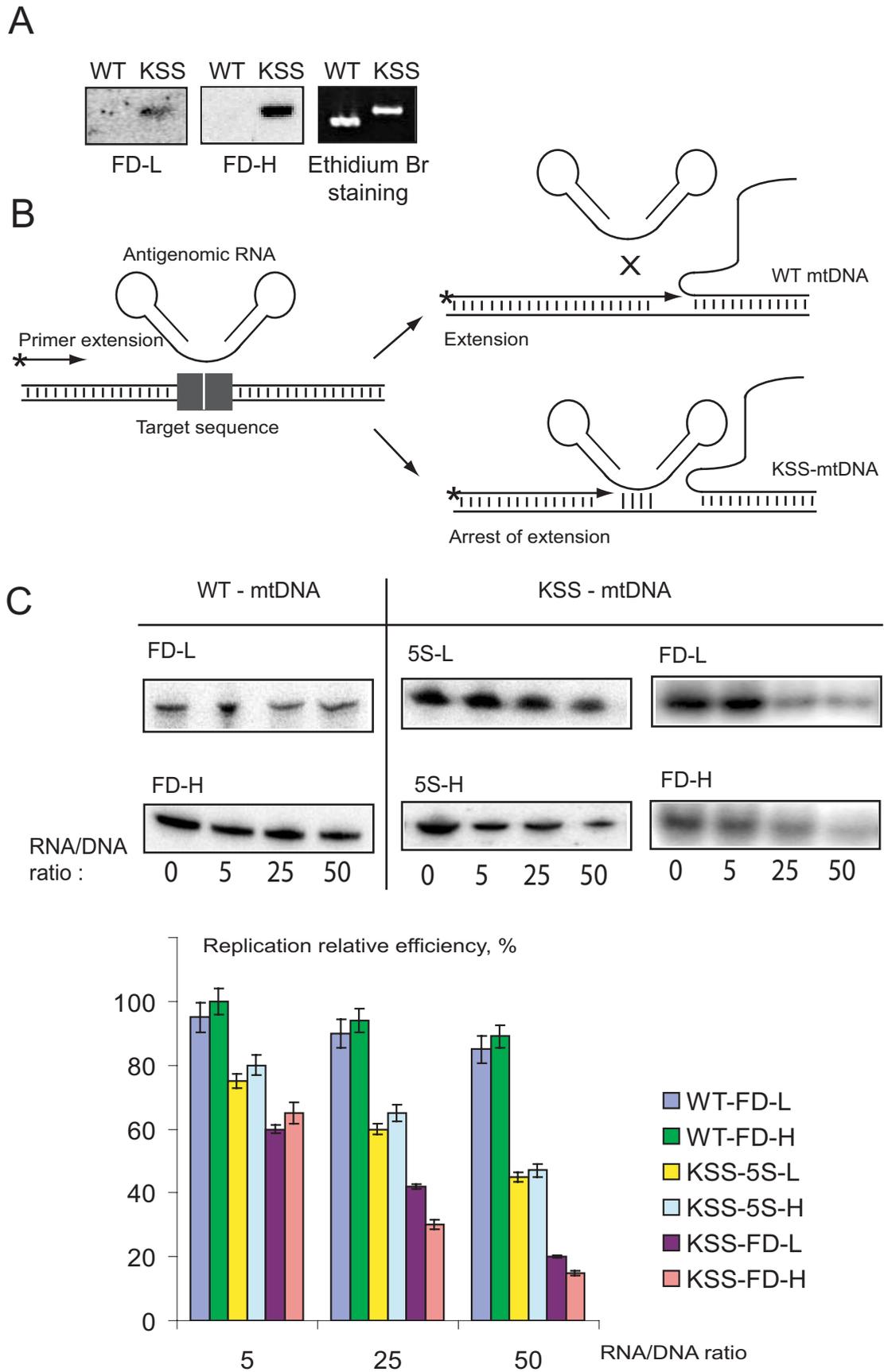
**Figure 1.** KSS-deletion in human mtDNA and antigenomic RNAs design. **(A)** Genetic maps of wild type and mutated KSS mtDNAs. **(B)** Secondary structure of human 5S rRNA and its functional elements (modified from (20)). Below, secondary structures of recombinant 5S rRNA  $\beta$ -domains (inserts in red). The arrows show the deletion point. **(C)** The structures of yeast tRNA<sup>Lys</sup>, short synthetic FD-RNA and two recombinant RNAs containing inserts corresponding to L- and H-strands of KSS-mtDNA (in red). Two domains derived from the tRNA (21) are shown in pink and blue. The arrows show the deletion point.

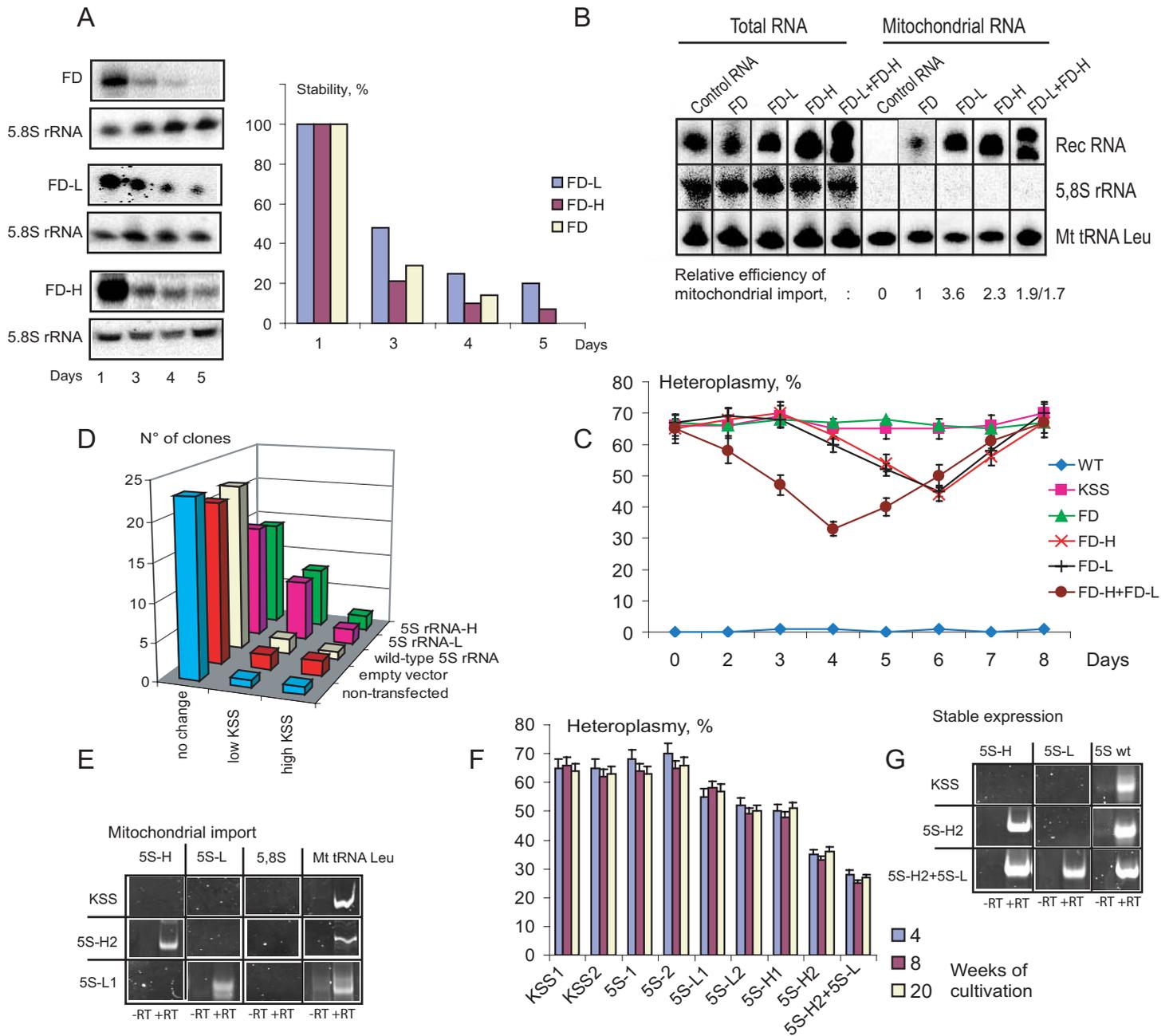
**Figure 2.** Effect of recombinant RNAs on mtDNA replication *in vitro*. **(A)** Southern hybridization of wild-type or KSS mtDNA fragments with labeled recombinant RNAs (FD-L and FD-H) at 37°C. **(B)** Scheme of anti-genomic strategy. **(C)** Autoradiographs of denaturing PAAG demonstrating *in vitro* replication of KSS or wild type mtDNA fragments in the presence of increasing amounts of recombinant RNAs. The diagrams represent the inhibition of mtDNA replication by recombinant RNAs; 100%, replication in absence of RNA ( $\pm$ SD,  $n > 4$ ).

**Figure 3. Analysis of the effect of recombinant RNAs mitochondrial targeting on heteroplasmy *in vivo*.** **(A)** Recombinant RNAs stability in transiently transfected KSS cybrid cells. Northern hybridization of total RNA with probes against FD-RNAs (FD, FD-L, FD-H) and control 5,8S rRNA used to quantify the recombinant RNA decay. **(B)** Mitochondrial import of recombinant FD-RNAs in transiently transfected cybrid cells. Northern hybridizations of RNAs extracted from cells or purified mitochondria 48h after transfection. Above, RNAs used for transfection are indicated; Control is an artificial RNA not imported

into mitochondria (**Fig. S3**). Relative efficiencies of mitochondrial import are shown below, import of FD-RNA is taken as 1 ( $\pm$ SD=0.1,  $n=3$ ). (**C**) Time-dependence of heteroplasmy upon transient transfection of cells; KSS, mock-transfected cybrid cells ( $\pm$ SD,  $n=3$ ). (**D**) Number of individual clones of KSS cybrids after the stable transfection with 5S rRNA genes. "No change", clones where the heteroplasmy shifts were comparable to natural fluctuation values (0-5%); "low KSS" - the proportion of KSS mtDNA reduced by >10%; "high KSS", the proportion of KSS deletion increased by >10%. (**E**) Mitochondrial import of recombinant 5S rRNAs detected by RT-PCR. Amplified RNAs are indicated above the panel, cell lines are shown at the left: KSS, mock-transfected cells; 5S-H2, clone expressing 5S-H RNA; 5S-L1, clone expressing 5S-L RNA. -RT, control without reverse transcriptase. (**F**) Stability of the heteroplasmy in individual clones. Two clones of each series are presented: KSS, mock-transfected KSS cybrid cells; 5S, cells transfected with the wild type 5S rRNA gene; 5S-H and 5S-L, cells transfected with corresponding recombinant 5S RNA genes; 5S-H2+5S-L, clone 5S-H2 transfected with 5S-RNA-L gene ( $\pm$ SD,  $n=3$ ). (**G**) Expression of both recombinant 5S RNAs in cell line 5S-H2+5S-L demonstrated by RT-PCR.







## **SUPPLEMENTARY MATERIAL**

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

Caroline Comte<sup>1</sup>, Anne-Marie Heckel-Mager<sup>1</sup>, Abdeldjalil Boucheham<sup>1</sup>, Alexandre Smirnov<sup>1</sup>, Karine Auré<sup>2#</sup>, Anne Lombès<sup>2</sup>, Robert P. Martin<sup>1</sup>, Nina Entelis<sup>1\*</sup>, Ivan Tarassov<sup>1\*</sup>

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

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

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

**Content:**      **Clinical case**  
  
**Table S1**  
  
**Legends to Supplementary Figures**  
  
**Supplementary Figures S1-S3**

## Clinical case

Patient T was diagnosed with a Kearns Sayre Shy syndrome at the age of 15 years. He was the second child of non-consanguinous parents and had a healthy brother. He first came to medical attention at the age of 9 years for progressive left ptosis, ophthalmoplegia, mild deafness and walking difficulties. He was hospitalized at the age of 15 years. Physical examination disclosed mild ataxia and muscle weakness with amyotrophy. Brain imaging showed white matter hypersignals. Biological analyses showed high CK at 10 times normal values, high protein (2.65 g/L) and lactate (5.6 mM) levels in CSF and high lactate (2.7 mM) in blood. Histological examination of deltoid muscle biopsy showed numerous fibres with important mitochondrial proliferation (“ragged red fibres”) and completely defective cytochrome c oxidase histochemical reaction. Spectrophotometric assays of muscle mitochondrial activities showed high values of both citrate synthase and succinate dehydrogenase activities (above the 95<sup>th</sup> centile of normal values) reflecting the muscle mitochondrial proliferation as well as low values (below or at the 5<sup>th</sup> centile of normal values) for cytochrome c oxidase (complex IV) activity and for the ratios of complex I, III or IV activity to either citrate synthase or complex II. Southern blot analysis of total DNA from muscle showed the presence of a large size deletion involving 72% of the mtDNA molecules. Direct sequencing of the patients mtDNA showed that the deletion spanned from nucleotide 8363 to 15438 thus removing 7075 base pairs including 9 structural genes (*MT-ATP8*, *MT-ATP6*, *MT-CO3*, *MT-ND3*, *MT-ND4L*, *MT-ND4*, *MT-ND5*, *MT-ND6* and part of *MT-CYB*) and 6 tRNA genes (*MT-TG*, *MT-TR*, *MT-TH*, *MT-TS2*, *MT-TL2* and *MT-TE*).

**Table S1. Oligonucleotides used in this study.**

<b>Name</b>	<b>Sequence, 5'&gt;3'</b>	<b>Purpose</b>
FDpcr	AAGAGCCCTGTAGGG	FD-RNAs detection
T7pr	GGGATCCATAATACGACTCACTATA	T7 promotor
1095 F	TAGCCCTAAACCTCAACAGT	qPCR for 12S rRNA gene quantification
1305B	TGCGCTTACTTTGTAGCCTTCAT	qPCR for 12S rRNA gene quantification
11614F	CATTGCATACTCTTCAATCAGC	qPCR for KSS deletion quantification
11778B	CGACTGTGAGTGCGTT	qPCR for KSS deletion quantification
Control RNA	GAGAACTAAGCACTG	Control RNA detection by Northern hybridization
FD	GAGTCATACGCGCTACCGATTGCGCCAACAA GGC	FD-RNAs detection by Northern hybridization, homology to the D-arm of tRK1
15251- 15680F	CTTAAAGCTTCACACGATTCTTTACCTTTC	Cloning of the WT mtDNA fragment 15251-15680, forward
15251- 15680R	TCTTTGGAATTCGTTTGGATATATGGAGGATG G	Cloning of the WT mtDNA fragment 15251-15680, reverse

8099- 8365/15438 -15680F	TACTACAAGCTTACAGATGCAATTCCCGGACG	Cloning of the KSS mtDNA fragment 8099- 8365/15438-15680, forward
8099- 8365/15438 -15680R	TCTTTGGAATTCGTTTGGATATATGGAGGATG G	Cloning of the KSS mtDNA fragment 8099- 8365/15438-15680, reverse
5.8S Hm F/T7	TAGATCTAATACGACTCACTATAGACTCTTAG CGGTGG	RT-PCR of 5.8S rRNA
5.8S Hm R	GGCCGCAAGTGCGTTCGAAG	Northern hybridization and RT-PCR of 5.8S rRNA
KSSrtF	CCTGAATACAGTGCTTAC	RT-PCR 5S-KSS-L
KSSrtR	CCTGAAAAGTAAGCACTG	RT-PCR 5S-KSS-H
KSS-F-bio	biotin-TCAGTAGACAGTCCCACCCTC	purification of ssDNA- KSS, forward
WT-F-bio	biotin-ACAGATGCAATTCCCGGACG	purification of ssDNA- WT, reverse
R-bio	biotin-GTTTGGATATATGGAGGATGG	purification of ssDNA- KSS, reverse
HmLmit	GAACCTCTGACTGTAAAG	mt-tRNA-Leu detection by Northern hybridization

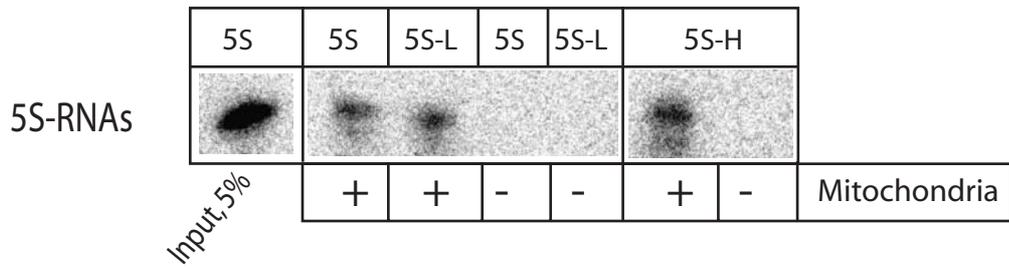
## Legends to the supplementary Figures

**Figure S1.** *In vitro* import of the recombinant RNAs. Autoradiography of a denaturing 10% PAAG is presented in (A), 5S rRNA derived molecules and (B), FD-RNA derived ones. "Input", 1-5% of RNA used for each assay, representing 30-150 fmoles of labeled RNA. Mitochondria (+) corresponds to the import assay, Mitochondria (-) to the mock import assay without mitochondria, used as a control for non-specific protein-RNA aggregation. (C) The diagrams represent the import efficiencies, expressed in fmoles of protected RNA to 0.1 mg of mitochondrial protein, as described elsewhere (19-21).  $\pm$ SD; n=3-6, as detailed upon each graph.

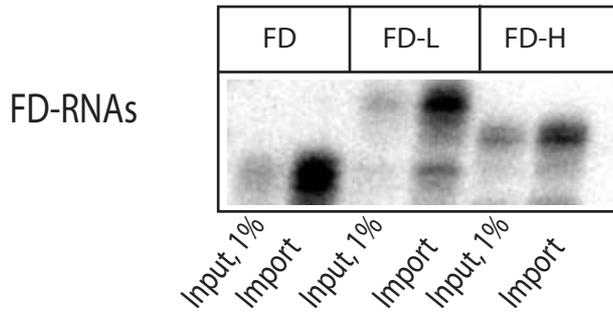
**Figure S2.** Analysis of the stability of the heteroplasmy levels in the cell lines used. 143B is the parental osteocarcinoma cell line, KSS - cybrid cells generated in this study. (A) The heteroplasmy levels were measured in a regular way during 5 months, as indicated.  $\pm$ SD; n=3-5. The observed variation of the deletion amount was less than 5% along all the period analyzed. (B) Direct sequencing of PCR-amplified deletion borders upon a 3-month cultivation of KSS cybrid cells. The fluorescent pattern of automated sequence is presented. No heterogeneity at the joint point was observed.

**Figure S3.** Sequence and predicted secondary structure of a short artificial RNA designed and used as a negative control for mitochondrial import assays. This RNA resembles the recombinant FD-RNAs by its size and secondary structure, but does not contain the import determinants characterized previously (21).

A



B



C

Import efficiency :  
fmol of RNA / 0.1mg mitochondrial protein

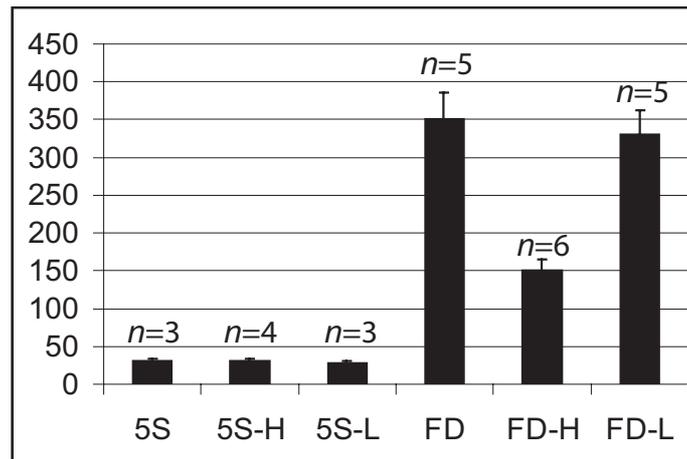
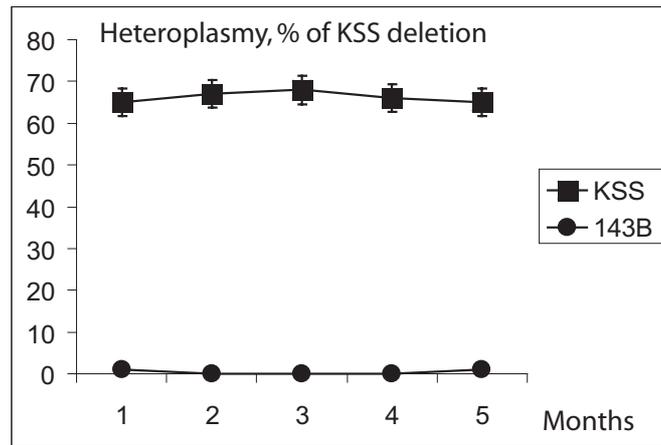


Figure S1

A



B

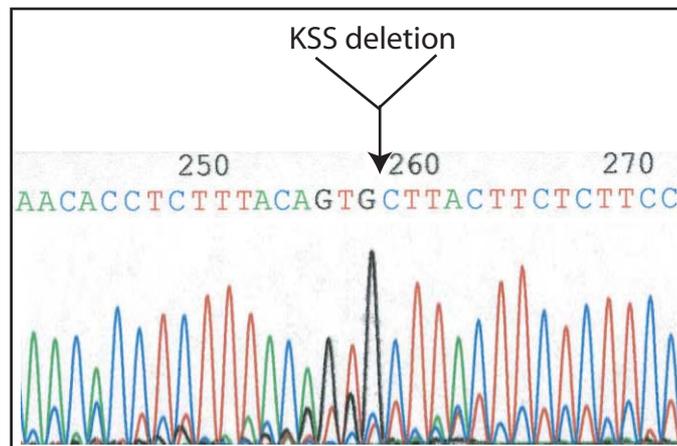
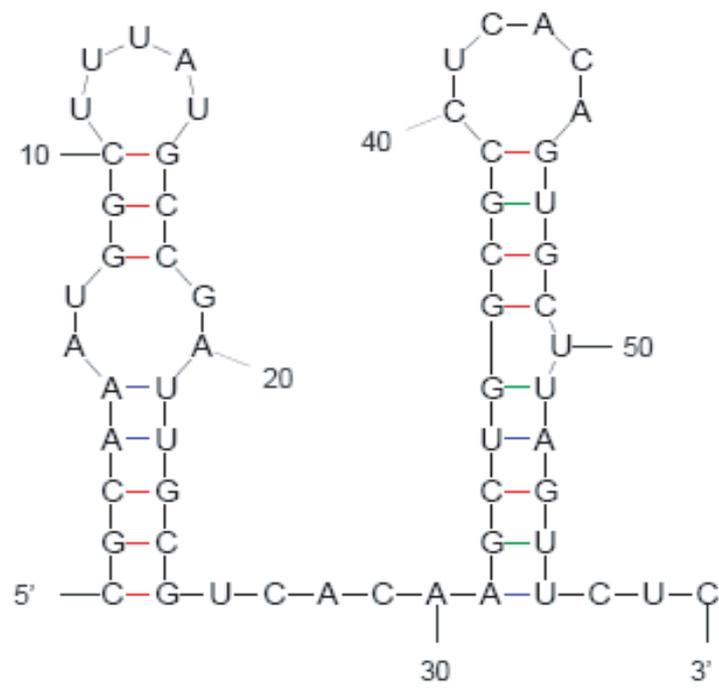


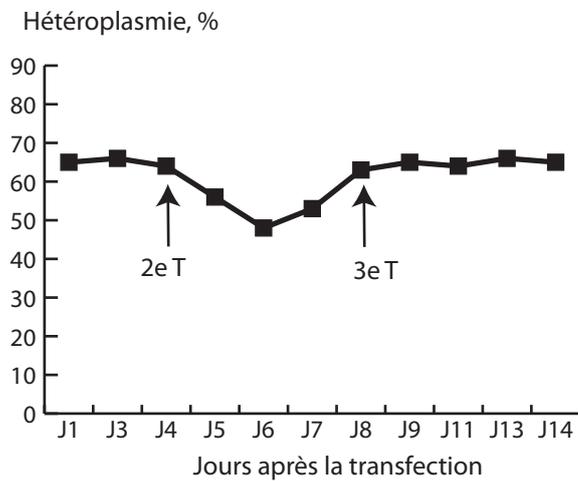
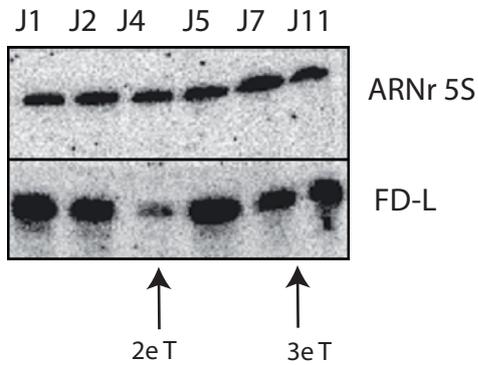
Figure S2



Control RNA

Figure S3





**Figure 33: Effet sur le taux d'hétéroplasmie de transfusions consécutives des cellules par les ARN recombinants**

Panel du haut: Hybridation d'ARN total extrait des cellules cybrides différents jour après leur transfection (indiqués au dessus du gel) avec des sondes contre les ARN recombinants et l'ARNr 5S (indiqués à droite du gel). Les flèches indiquent les jours où les cellules ont été retransfectées.

En bas: Graphique représentant le taux d'hétéroplasmie en fonction des jours suivant la transfection. Les flèches indiquent le moment des retransfections.

Retransfection des cellules par l'ARN FD-L 4 et 8 jours après la première transfection.

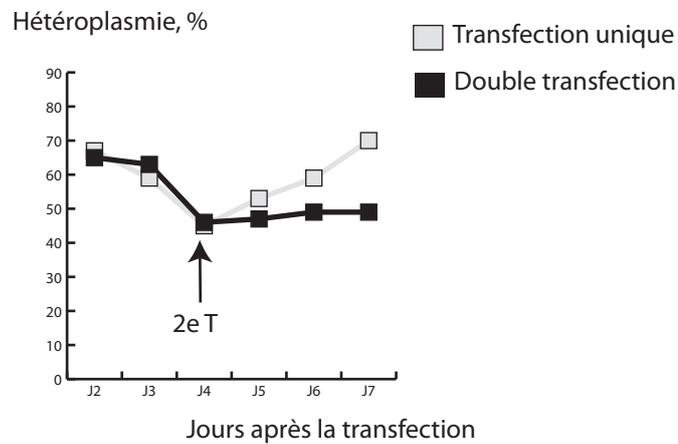
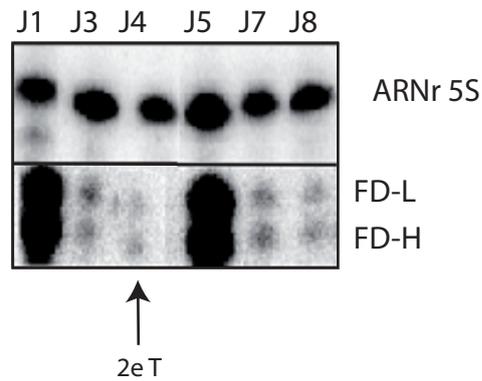
### III Tentatives d'optimisation de la stratégie anti-génomique

Les résultats obtenus en transfectant les cellules cybrides de façon transitoire avec les ARN recombinants FD-L et FD-H sont prometteurs mais demandent d'être optimisés en vue d'une potentielle application thérapeutique. En effet si on s'attendait à ce qu'il suffise d'induire une baisse du taux d'ADNmt muté pour que le taux d'ADNmt sauvage remonte et se stabilise naturellement, cela ne semble pas être le cas. En conséquence, différentes options ont été investiguées afin de stabiliser l'effet des ARN recombinants sur le taux d'hétéroplasmie : transfecter les cellules par les ARN recombinants de façon consécutive ou de façon stable, changer l'insert de place dans la structure de l'ARN F1D1 et enfin ajouter des modifications chimiques sur certains nucléotides de l'insert.

#### 1 Transfections consécutives des cellules cybrides

Les transfections transitoires des cellules cybrides avec les ARN FD-L et FD-H ont permis d'obtenir une baisse transitoire du taux d'hétéroplasmie, suivi du retour du taux d'ADNmt muté à son niveau initial. Cette remontée semblant coïncider avec la disparition des ARN recombinants, on peut imaginer que la présence en continu de ces derniers dans la cellule pourrait permettre une diminution durable du taux d'hétéroplasmie, voire la disparition totale de l'ADNmt muté. Afin de tester cette hypothèse, des transfections consécutives des cellules cybrides par les ARN recombinants ont été effectuées. Les cellules ont d'abord été transfectées avec l'ARN FD-L puis retransfectées quatre et huit jours plus tard. Ces transfections successives ont permis de maintenir la présence des ARN dans les cellules sur une période d'au moins 11 jours (**Figure 33**). Comme obtenu habituellement avec l'ARN FD-L, une baisse de 20% du taux d'hétéroplasmie est observée 6 jours après la première transfection mais ce taux remonte à 65% dès le 8<sup>e</sup> jour malgré la présence des ARN. De plus, la troisième transfection réalisée le 8<sup>e</sup> jour ne permet pas d'obtenir une deuxième baisse de l'hétéroplasmie 6 jours plus tard (à savoir à 14 jours après la première transfection).

Les cellules ont ensuite été transfectées avec les deux ARN FD-H et FD-L à la fois. Cette fois-ci les cellules ont été retransfectées quatre jours plus tard, soit le jour où la baisse du taux d'ADNmt muté est la plus prononcée. Cette stratégie a permis d'obtenir une



**Figure 34: Effet sur le taux d'hétéroplasmie de transfactions consécutives des cellules par les ARN FD-L et FD-H en même temps**

Panel du haut: Hybridation d'ARN total extrait des cellules cybrides différents jour après leur transfection (indiqués au dessus du gel) avec des sondes contre les ARN recombinants et l'ARNr 5S (indiqués à droite du gel). Les flèches indiquent les jours où les cellules ont été retransfectées.

En bas: Grahique représentant le taux d'hétéroplasmie en fonction des jours suivant la transfection. Les flèches indiquent le moment des retransfections.

stabilisation du taux d'ADNmt muté à 45% jusqu'au septième jour (**Figure 34**). Ces résultats sont préliminaires et les cellules devront continuer à être prélevées afin de déterminer si le taux d'hétéroplasmie remonte après le 7<sup>e</sup> jour. Ils semblent toutefois démontrer qu'il est possible d'obtenir une stabilisation de la baisse d'hétéroplasmie lorsque les ARN recombinants sont présents en continu dans les cellules.

## 2 Transfection stable

Les transfections transitoires consécutives ont eu le mérite de montrer qu'il était possible d'obtenir une baisse prolongée du taux d'hétéroplasmie. Ce traitement n'est toutefois pas satisfaisant dans l'optique de la mise en place d'un essai thérapeutique et aboutit de plus à un fort taux de mort cellulaire. La transfection stable des cellules pourrait être mieux appropriée pour permettre une expression des ARN recombinants durable dans les cellules. Cette hypothèse est confortée par les résultats obtenus dans la publication présentée précédemment p66. En effet, la transfection stable des cellules cybrides par un plasmide exprimant l'ARNr 5S utilisé comme vecteur des inserts au potentiel anti-réplicatif a abouti à l'obtention de clones possédant un taux d'ADNmt muté diminué de façon durable. L'approche de la transfection stable repose sur l'intégration du gène étudié dans le génome nucléaire, cette intégration se faisant par le biais d'un plasmide adressé dans la cellule.

Notre choix s'est porté sur un plasmide permettant d'exprimer des ARN possédant certaines caractéristiques similaires aux ARN F1D1, FD-L et FD-H, à savoir des ARN non codants d'une cinquantaine de bases. Ce plasmide, dénommé psiRNA, est commercialisé pour exprimer des ARN interférents de type shRNA (short hairpin RNA) sous le contrôle d'un promoteur externe de la polymérase III, le promoteur 7SK. Les séquences correspondant aux ARN F1D1, FD-L et FD-H ont été clonées dans ce plasmide selon les instructions du fournisseur de telle façon à avoir un G en première position de l'ARN et une séquence poly T en 3' servant de signal de terminaison à la transcription. Après avoir vérifié la séquence des constructions par séquençage, les cellules cybrides ont été transfectées avec les plasmides recombinants puis sélectionnées pour leur résistance à un antibiotique, l'hygromycine. Après plusieurs semaines de culture dans ces conditions, plusieurs clones ont été obtenus et analysés pour leur capacité à exprimer les ARN recombinants. Toutefois, aucune expression des ARN n'a pu être observée dans les cellules résistantes à l'antibiotique. L'expression stable de gènes ne correspondant pas à des shRNA est pourtant possible, celle de l'ARNt TRK1 ayant pu être



**Figure 35 : Structures secondaires prédites par le logiciel MFold de la nouvelle série d'ARN recombinants**

obtenue au laboratoire avec le même plasmide. On peut donc imaginer que les ARN recombinants artificiels, non reconnus comme des ARN endogènes, ne puissent pas être exportés du noyau et y soient dégradés. Il est également possible que malgré leur résistance à l'antibiotique, les clones obtenus n'aient pas intégré le transgène. Cette éventualité a été testée en amplifiant le gène par PCR à partir d'un extrait d'ADN total mais, bien qu'un signal correspondant à la taille attendue ait été obtenu pour tous les clones testés, ce fut également le cas dans les témoins négatifs correspondant aux cellules non transfectées. Il n'a donc pas été possible de déterminer la cause exacte de l'absence d'expression des ARN recombinants dans les cellules cybrides résistantes à l'hygromycine.

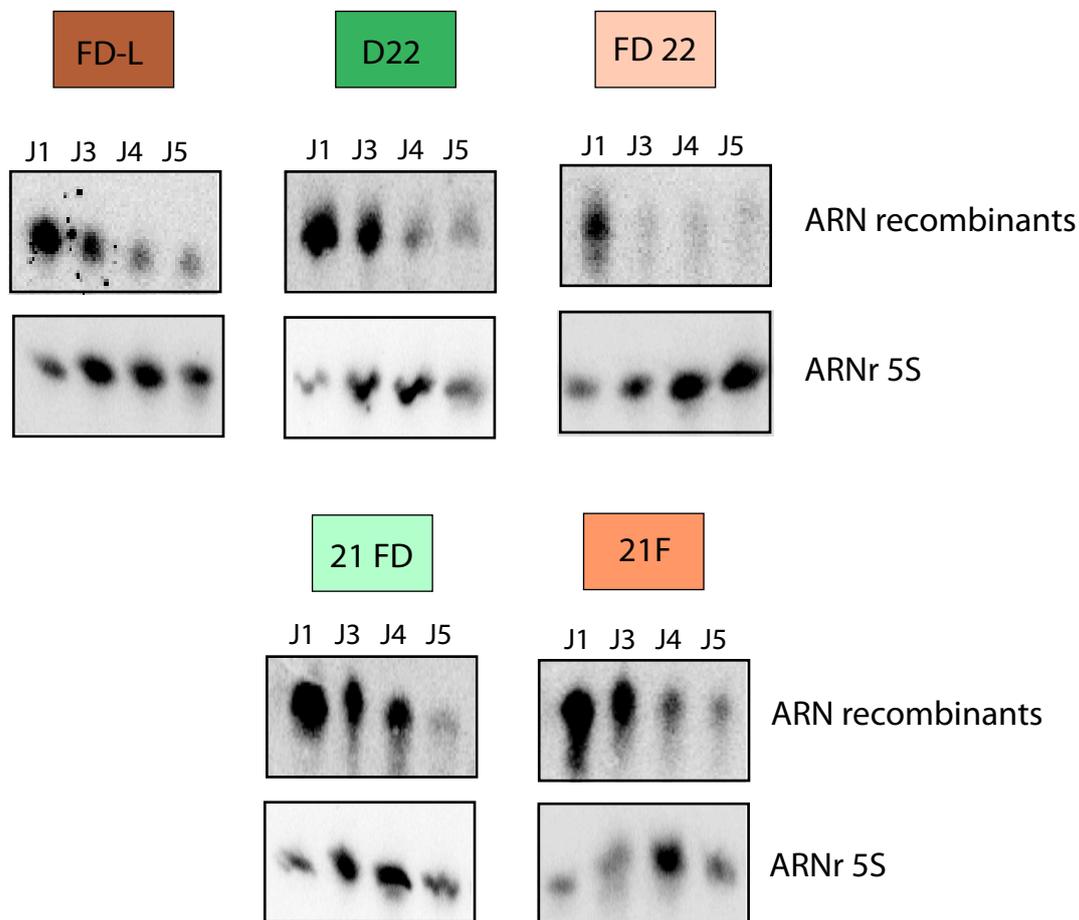
### 3 Construction de nouveaux ARN recombinants

#### 3.1 Modélisation de la structure des nouveaux ARN au potentiel anti-réplicatif

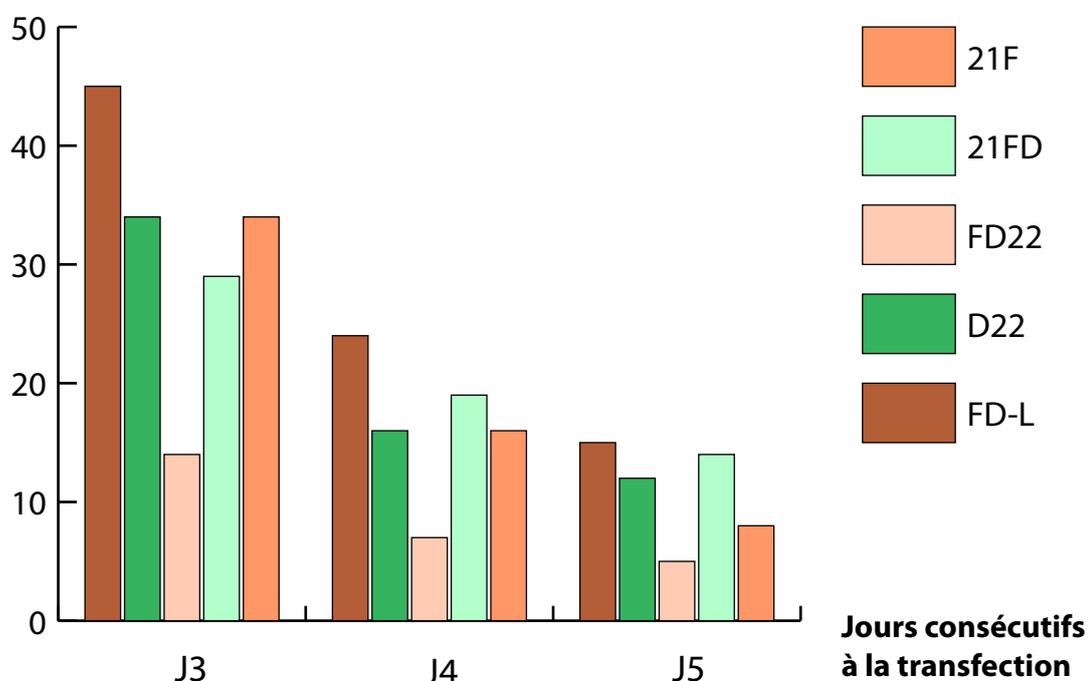
Les ARN FD-L et FD-H contenant l'insert anti-réplicatif entre les hélices D et F, il est possible que cela induise une déstabilisation de l'hybridation ARN/ADN. Afin de tenter de rendre l'insert plus accessible pour une hybridation avec l'ADNmt, quatre nouvelles constructions ont été créées. Seul l'insert de 22 bases s'hybridant au brin H de l'ADNmt muté a ici été utilisé (**Figure 35**).

Dans un premier temps l'insert a été conjugué en 3' ou en 5' de l'ARN F1D1.

- Pour l'insert conjugué en 3' de l'ARN F1D1 les hélices D et F sont reliées par deux bases GU et un G est ajouté en 5'. L'ARN en résultant est dénommé l'**ARN FD22**.
- Pour l'insert inséré en 5' de l'ARN FD les hélices D et F sont reliées par deux bases UU et la première base de l'insert est remplacée par deux G non complémentaire au brin H. L'ARN qui en résulte possède un insert de 21 bases et est appelé l'**ARN 21FD**.



### Stabilité relative des ARN dans les cellules, %



**Figure 36: Analyse de la stabilité des ARN recombinants dans les cellules cybrides transfectées de façon transitoire.**

A) Hybridation des ARN totaux avec une sonde contre les ARN recombinants et l'ARNr 5S. Les ARN utilisés pour la transfection sont indiqués au dessus des gels.

B) Histogramme représentant le pourcentage relatif d'ARN recombinant dans les cellules 3,4 et 5 jours après la transfection

Deux autres ARN ont ensuite été modélisés en séparant l'hélice D et l'hélice F.

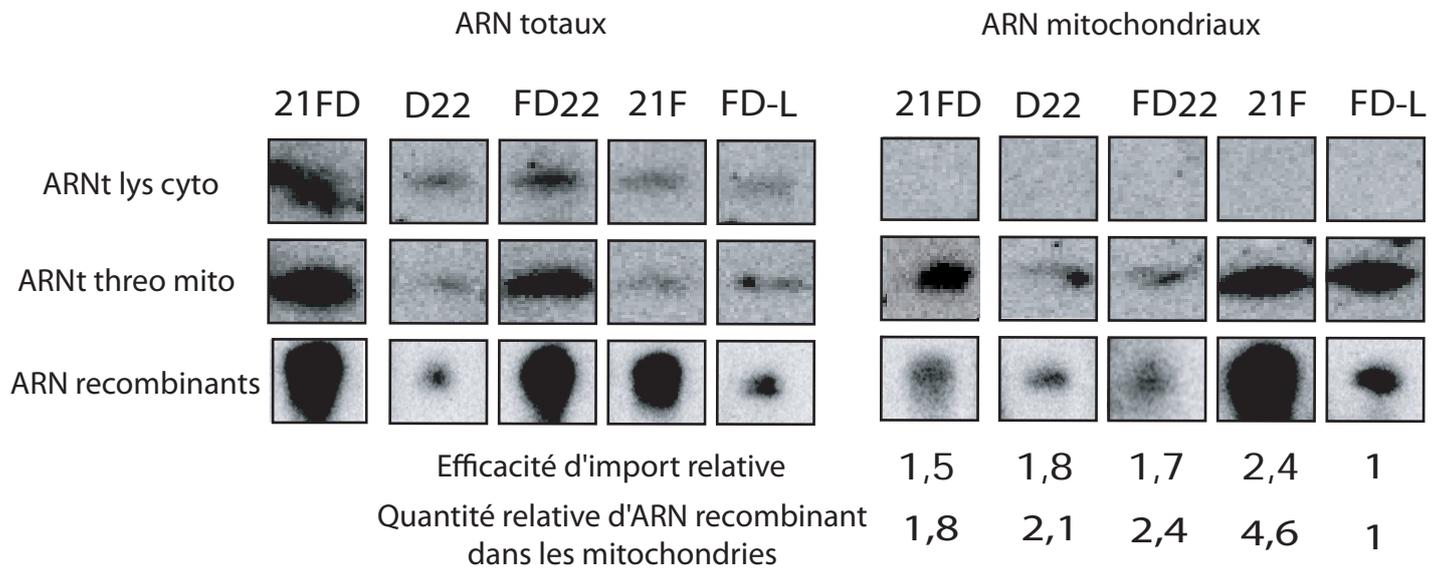
- L'insert a été conjugué en 3' de l'hélice D résultant à l'**ARN D22**
- L'insert a été conjugué en 5' de l'hélice F. La première base de l'insert est remplacée par deux G non complémentaires au brin H de l'ADNmt muté conduisant à un insert de 21 bases. Il est à noter que cet insert ne contient pas de mésappariement. D'autre part deux bases CA remplacent les deux bases UU en 3' de l'hélice F. Cette construction est dénommée l'**ARN 21F**.

Les changements opérés dans les structures de ces quatre ARN sont dues aux mêmes raisons que celles explicitées dans le paragraphe II.1.2 des résultats, à savoir le maintien de la structure des hélices D et F et de l'insert sous une forme simple brin.

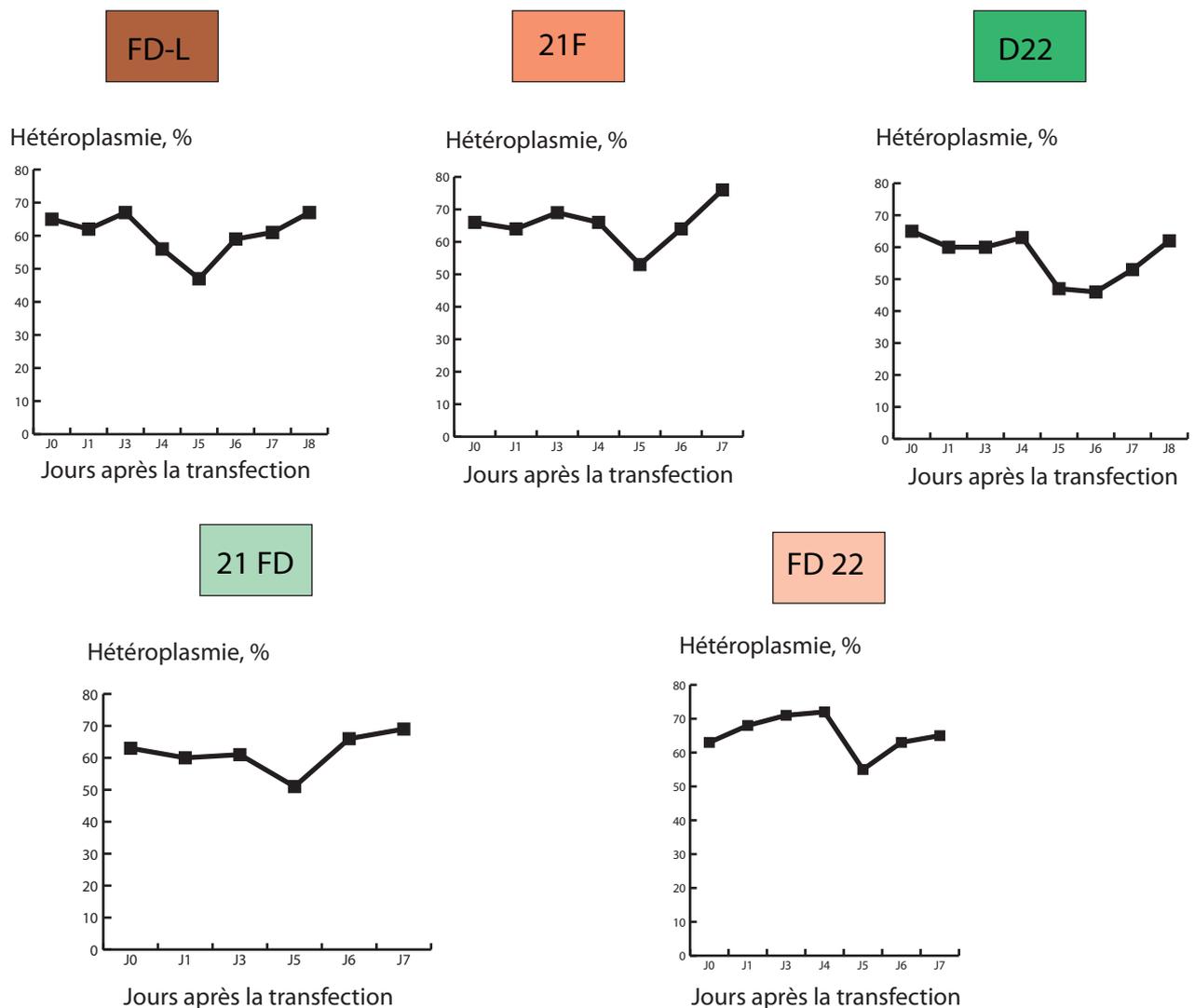
Une fois synthétisés, les ARN 21FD, FD22, D22 et 21F ont servi à la transfection des cellules cybrides. Leur stabilité, leur efficacité d'importation et leur effet sur le taux d'ADNmt muté ont ensuite été analysés selon les mêmes méthodes que celles décrites au chapitre II.

### 3.2 Etude de la stabilité et de l'import

Concernant le pourcentage d'ARN présent dans les cellules au cours des différents jours suivant la transfection, on aurait pu s'attendre à ce que les nouveaux ARN aux extrémités simples brins soient moins stables que l'ARN FD-L possédant deux hélices en 5' et en 3'. En effet, les extrémités simples brins sont en théorie plus susceptibles d'être dégradées par des exonucléases. En accord avec cette supposition, l'ARN FD22 montre une stabilité inférieure aux autres ARN, et l'ARN FD-L semble le plus stable de tous les ARN testés ici (**Figure 36**). Cette différence est toutefois minime. De plus, il est difficile de dégager une différence notable de stabilité entre les ARN 21F, 21FD et D22 alors que ce dernier présente un insert simple brin en 3' comme l'ARN FD22. La cinétique de dégradation de ces trois ARN est similaire et tous sont détectables au moins 5 jours après la transfection. En dehors des hypothèses déjà évoquées dans le paragraphe II.4.1, cette absence de différence de stabilité entre ces ARN recombinants pourrait s'expliquer par le fait qu'il est probable que les inserts, contrairement à ce qui avait été prédit par le logiciel Mfold, ne reste pas simple brin mais adoptent des structures alternatives locales en forme d'hélice. Il est également possible que l'insert induise un réarrangement global de l'ARN, détruisant la structure des



**Figure 37: Analyse de l'importation des ARN recombinants dans les mitochondries des cellules cybrides.** Les ARN totaux et mitochondriaux (indiqués au dessus du gel) sont hybridés avec des sondes contre l'ARNt cytosolique lysine, l'ARNt mitochondrial threonine et les ARN recombinants (indiqués à gauche du gel). Les efficacités d'import relative et les quantités d'ARN recombinant dans la fraction d'ARN mitochondriale relatives à F1D1 sont indiquées sous le gel.



**Figure 38: Graphiques représentant l'effet des ARN recombinants sur le taux d'hétéroplasmie.**

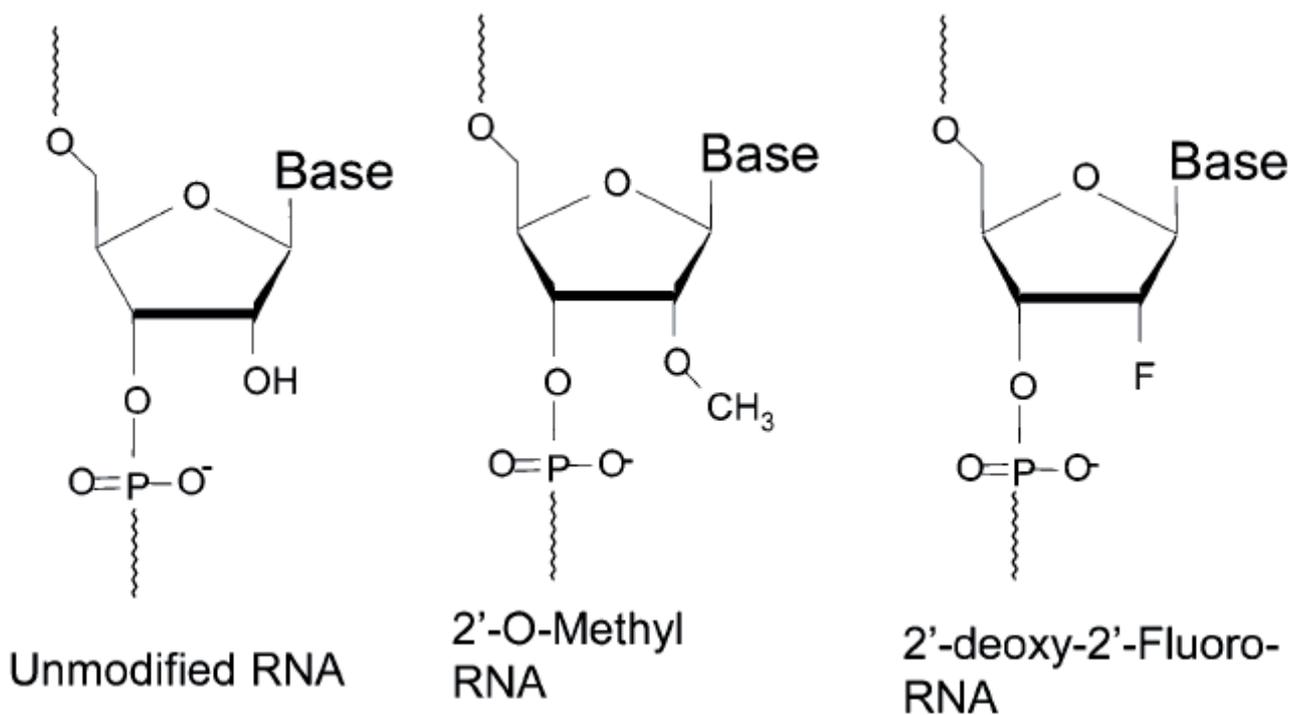
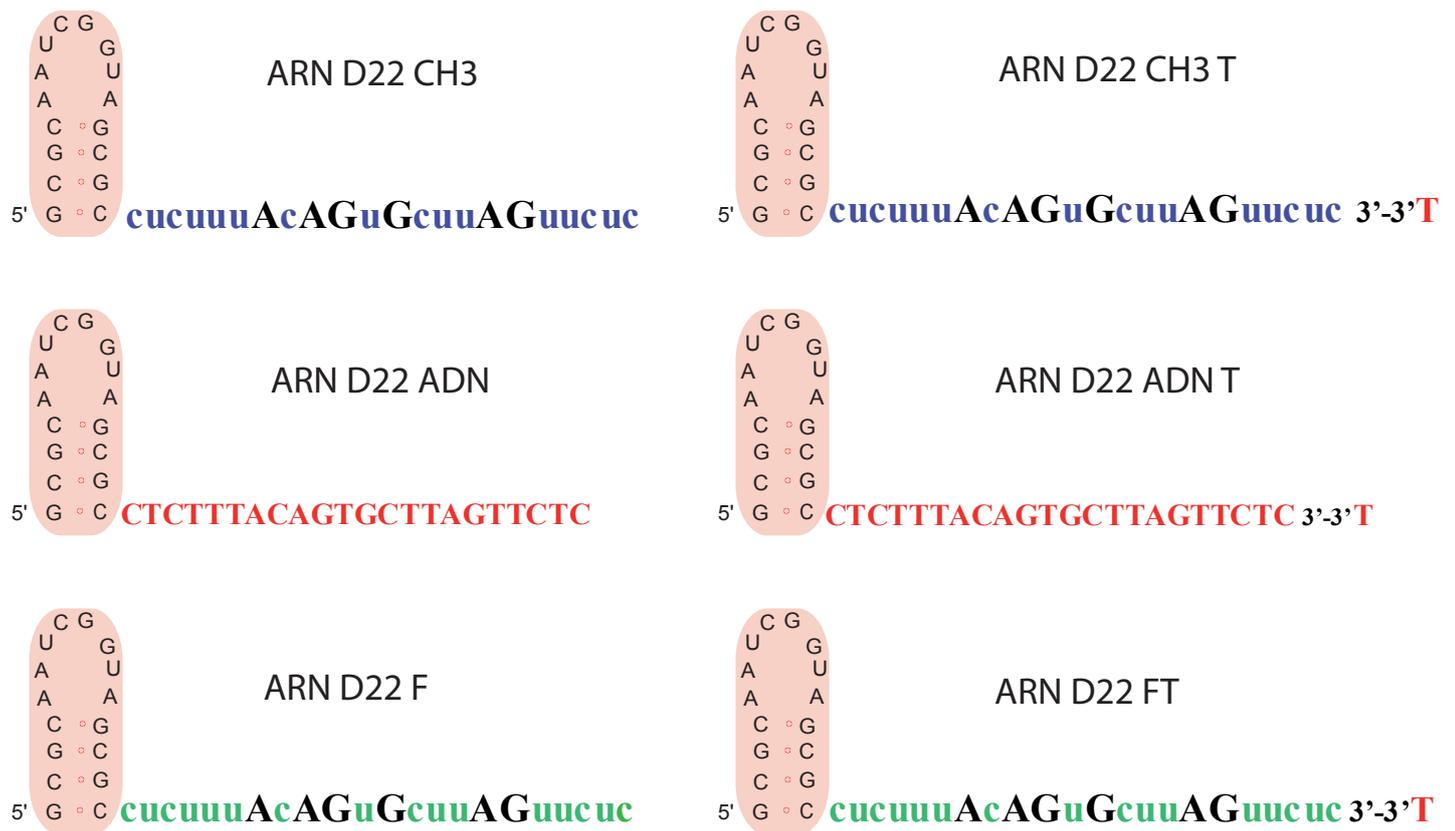
déterminants d'import, les hélices F et D, ce qui pourrait avoir pour conséquence d'inhiber l'import des ARN.

Afin de tester cette dernière hypothèse, les ARN mitochondriaux ont été purifiés et analysés deux jours après la transfection des cellules avec les nouvelles versions d'ARN recombinants ainsi que l'ARN FD-L utilisé comme référentiel (**Figure 37**). Les résultats démontrent que tous les ARN sont retrouvés dans la fraction d'ARN mitochondriaux pure. Les déterminants d'import semblent donc avoir été préservés. Ces derniers se révèlent de plus capables d'être importés séparément (ARN D22 et 21F). Les efficacités d'import des ARN sont comparables à l'exception de celle de l'ARN 21F importé avec une efficacité 2,4 fois supérieure à FD-L. Ces résultats semblent en contradiction avec les résultats des tests d'import réalisés *in vitro* montrant que l'efficacité d'import des deux hélices fusionnées était supérieure à celle de l'hélice F (Publication n°1 p51).

### 3.3 Etude de l'effet sur l'hétéroplasmie

L'effet des ARN recombinants sur le taux d'ADNmt délété dans les cellules cybrides a ensuite été analysé. Les cellules ont été transfectées le même jour par les cinq ARN FD-L, 21FD, FD22, D22 et 21F en parallèle. Le jour J0 représenté **figure 38** en axe des abscisses correspond à un aliquot de cellules non transfectées utilisé comme témoin pour chaque qPCR. Les résultats obtenus montrent une baisse d'hétéroplasmie de 15% pour l'ARN 21F, de 10% pour l'ARN 21FD et FD22 et de 20% pour les ARN FD-L et D22. Le jour correspondant à la baisse du taux d'ADNmt muté la plus prononcée semble reproductible, ayant lieu 5 jours après la transfection de chaque ARN. L'effet le plus prononcé ayant été obtenu 6 jours après la transfection dans les expériences réalisées précédemment avec l'ARN FD-L (paragraphe X) il est probable que cette fluctuation soit due à l'état dans lequel se trouvent les cellules au moment de la transfection.

Il est à noter qu'on observe une augmentation du taux d'hétéroplasmie qui précède sa baisse pour les ARN FD22, 21F et FD-L. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que les résultats obtenus pour chaque ARN ne proviennent que d'une seule expérience. En l'absence de marge d'erreur, il est donc difficile de savoir si cette légère augmentation du taux d'ADNmt délété est significative. En se basant sur une déviation standard de +/- 5% du taux d'hétéroplasmie entre des expériences indépendantes réalisées dans les mêmes conditions, seule l'augmentation observée pour l'ARN FD22 pourrait être réelle. Si tel était le cas, on peut imaginer que la



**Figure 39: Modifications chimiques ajoutées au niveau de l'insert de l'ARN D22.**

Panel du haut: Structure des ARN modifiés. Les bases de l'insert en couleur correspondent aux bases pyrimidiques modifiées.

Panel du bas: Structure des nucléotides modifiés.

procédure de transfection puisse induire un stress cellulaire provoquant une augmentation de la réplication de l'ADNmt. En cas d'existence d'un avantage répliatif de l'ADNmt délété, il est possible que cela conduise à une augmentation spécifique du taux de l'ADNmt muté.

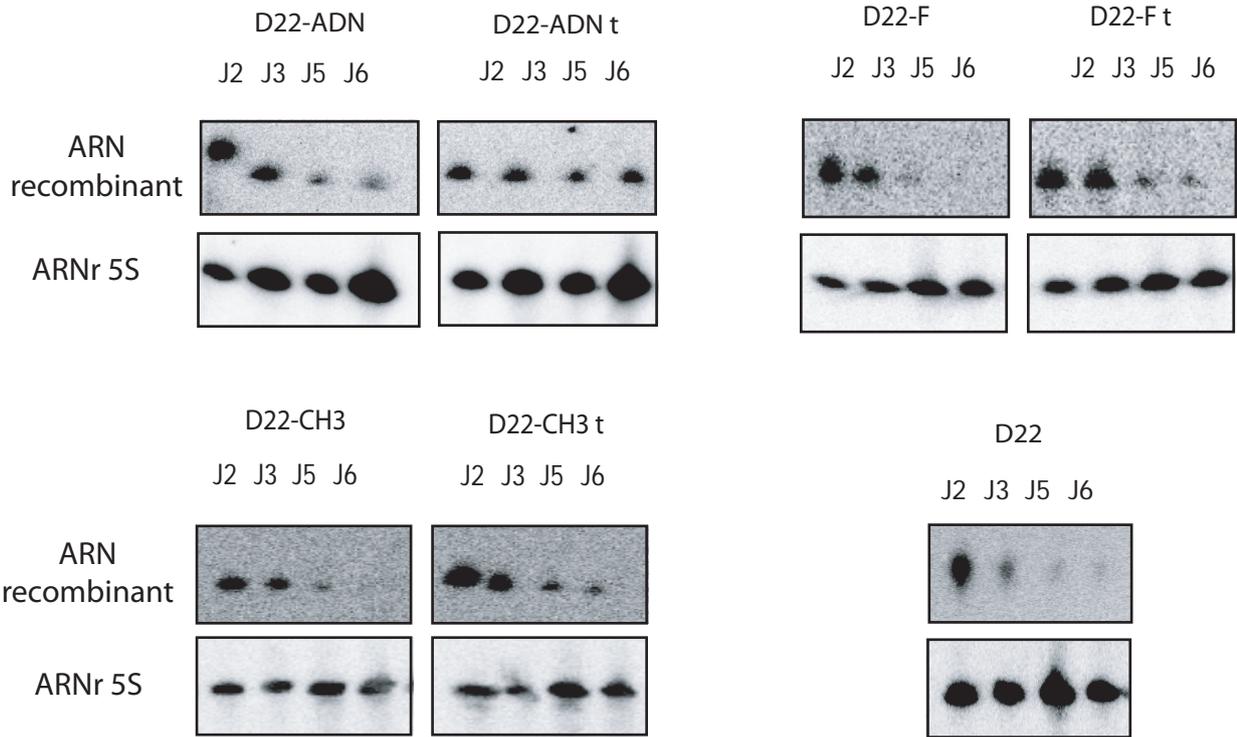
Pour conclure, les nouvelles versions d'ARN recombinants construites ont permis de confirmer les résultats obtenus avec les ARN FD-L et FD-H sur le taux d'hétéroplasmie mais n'ont pas permis de stabiliser la baisse observée. L'endroit où est placé l'insert dans la structure de l'ARN F1D1 ne semblent influencer significativement ni l'import des ARN ni leur efficacité d'inhibition sur la réplication des molécules d'ADNmt mutées.

## **4 Modification chimique de l'insert anti-répliatif**

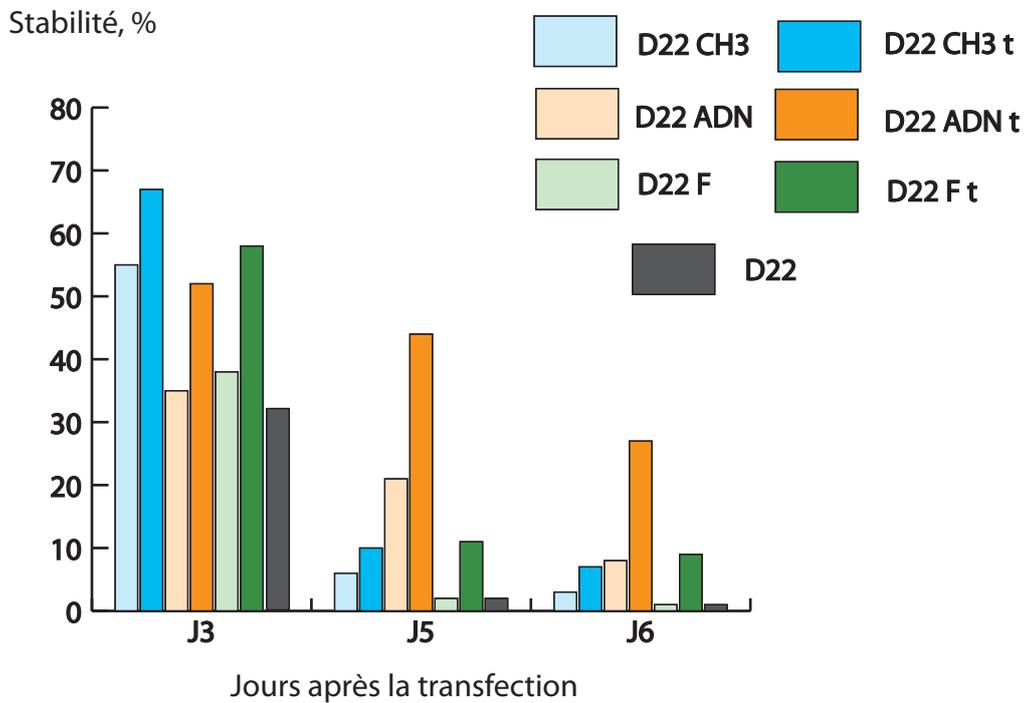
### **4.1 Modification des inserts**

Les transfections stables n'ayant pas permis d'obtenir une expression durable des ARN recombinants dans les cellules, nous avons tenté d'augmenter leur durée de vie par le biais d'une autre stratégie reposant sur l'ajout de modifications chimiques au niveau de l'insert. Les modifications chimiques permettent de rendre les ARN moins vulnérables aux RNases et d'augmenter la température de fusion de l'insert (Behlke, 2008). Le choix des modifications chimiques et la synthèse des ARN ont été réalisés dans le laboratoire de bionanotechnologie dirigé par Dmitrii Pyshnyi à Novosibirsk (Russie). Les ARN FD-L et FD-H étant difficiles à synthétiser de par leur longueur, le choix de l'ARN à modifier s'est fait entre les ARN D22 et 21F. L'ARN D22 a finalement été choisi du fait qu'il semble induire une baisse plus prononcée du taux d'hétéroplasmie que l'ARN 21F (Paragraphe III.3.3 des résultats). Les modifications chimiques ont été ajoutées uniquement au niveau de l'insert. En effet, l'hélice D est, de par sa structure, plus stable que l'insert simple brin. De plus, il n'est pas exclu que la présence de modifications au niveau de l'hélice D puisse perturber son interaction avec les facteurs protéiques nécessaires à son import. Les modifications ont donc été ajoutées uniquement au niveau de l'insert. Deux catégories de modifications ont été choisies. La première a consisté à modifier la position 2' du ribose des résidus pyrimidiques de l'insert en remplaçant le groupement OH par un groupement fluor (2'F) ou en remplaçant l'hydrogène par un groupement méthyl (2'OMe). Dans la même catégorie, le groupement 2'OH de tous les nucléotides de l'insert a été remplacé par un hydrogène et les bases uraciles en thymidine, conduisant à une molécule chimérique composée de l'hélice D en ARN et de

A



B



**Figure 40: Analyse de la stabilité des ARN modifiés dans les cellules cybrides**

A) Hybridation d'ARN total extrait des cellules cybrides différents jours (indiqués au dessus du gel) après leur transfection par les ARN modifiés avec une sonde contre l'ARNr 5S et les ARN modifiés (indiqué à droite du gel).

B) Histogramme représentant la stabilité des ARN modifiés 3, 5 et 6 jours suivant la transfection.

l'insert en ADN. Enfin, la deuxième catégorie de modifications a consisté à ajouter une thymidine en 3' des inserts. Cette thymidine est dite inversée car la liaison entre le dernier nucléotide de l'insert et la thymidine est de type 3'-3' phosphodiester, permettant de protéger l'extrémité 3' de l'action des 3'-5' exonucleases.

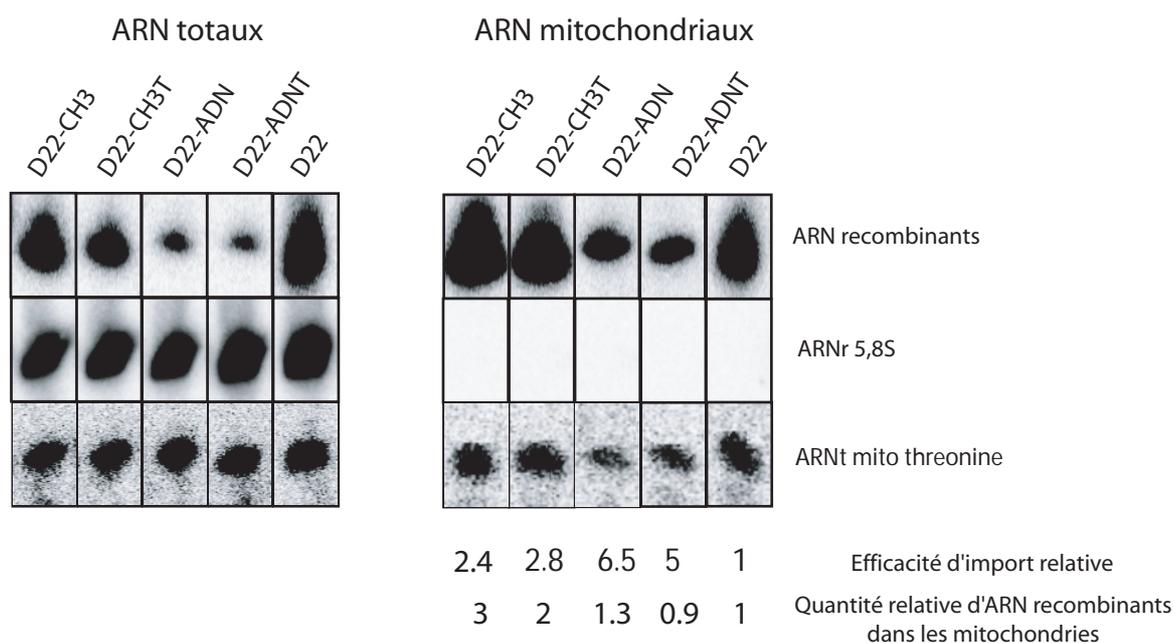
Au final, un panel de 6 ARN modifiés ont donc été synthétisés : D22-CH3, D22-F et D22-ADN ne contenant pas de thymidine inversée en 3' et les ARN D22-CH3T, D22-FT et D22-ADNT contenant la thymidine inversée en 3' de l'insert (**Figure 39**).

## 4.2 Etude de l'impact des modifications sur la stabilité des ARN

L'impact des modifications sur la stabilité des ARN dans les cellules cybrides a ensuite été évalué par comparaison avec l'ARN D22 non modifié (**Figure 40**). Le référentiel 100% correspond au 2<sup>e</sup> jour après la transfection, le premier jour n'ayant pas été prélevé. Les résultats montrent que la thymidine inversée permet d'augmenter sensiblement la stabilité de tous les ARN modifiés. Les groupement méthyles conduisent à une augmentation de stabilité des ARN jusqu'au 3<sup>e</sup> jour après la transfection. Les groupements fluors ne semblent pas quant à eux augmenter la stabilité des ARN, la quantité d'ARN D22-F présente dans les cellules 3, 5 et 6 jours après la transfection étant comparable à celle de D22. Finalement, c'est la conversion des ribonucléotides en désoxyribonucléotides qui permet d'augmenter avec la plus grande efficacité la stabilité de l'ARN. Ainsi, la quantité de l'ARN chimérique D22-ADN est supérieure à celle de D22 jusqu'au cinquième jour après la transfection. La combinaison de l'insert ADN à la thymidine inversée en 3' conduit au final à la plus grande stabilité, 30% de la quantité de l'ARN D22-ADNT présente au jours 2 étant encore détectable 6 jours après la transfection.

## 4.3 Etude de l'impact des modifications sur l'import

L'importation des ARN recombinants modifiés a ensuite été testée (**Figure 41**). Tous les ARN recombinants étant présents dans la fraction d'ARN mitochondriaux, on peut en conclure que les modifications chimiques n'inhibent pas l'import. Tout comme expliqué dans le chapitre II.4.4, l'efficacité d'import des ARN peut être comparée si leur stabilité est similaire. Les ARN modifiés ayant ici des stabilités différentes, cela introduit une variable qui ne permet pas cette comparaison. Ainsi, les efficacités d'import relatives semblent corrélées à



**Figure 41: Evaluation de l'efficacité d'import des ARN recombinants dans les mitochondries des cellules cybrides.**

Les fractions d'ARN totaux et mitochondriaux sont hybridées avec des sondes contre les ARN recombinants, contre l'ARNr 5,8S et l'ARNt mitochondrial threonine (indiqués à droite du gel). Les efficacités d'import relatives et les quantités d'ARN recombinants présents dans la fraction mitochondriale relatives à F1FD1 sont indiquées en dessous du gel.

D22	50°C
D22-CH3	56°C
D22-CH3T	56,5°C
D22-ADN	61,5°C
D22-ADNT	61,5°C
D22-F	62°C
D22-FT	62,5°C

**Figure 42: Températures de fusion des ARN recombinants déterminées de façon empirique par spectrophotométrie sous UV.**

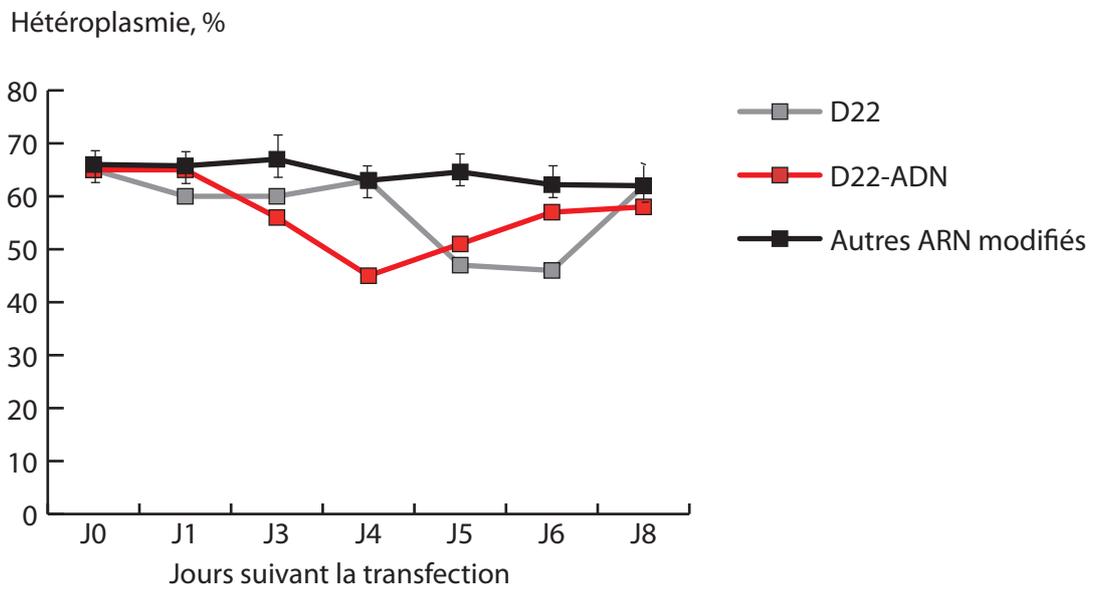
la stabilité de chaque ARN, les ARN D22-ADN et ADNT étant mieux importés que les ARN D22-CH3 et CH3T eux-même mieux importés que l'ARN D22 non modifié.

En calculant le ratio ARN recombinant / ARNt<sup>Thr</sup> mitochondrial de la fraction mitochondriale, on peut toutefois comparer la quantité de chaque ARN recombinant présent dans les mitochondries. Deux jours après la transfection, la quantité d'ARN D22-CH3 et CH3T dans les mitochondries est respectivement 3 et 2 fois supérieure à celle des ARN D22-ADN et ADNT et D22 non modifié. Concernant les ARN chimériques possédant un insert en ADN, ce résultat pourrait être dû à la faible efficacité de transfection observée en comparant les quantités d'ARN présents dans la fraction totale.

#### 4.4 Etude de l'impact des modifications sur le taux d'hétéroplasmie

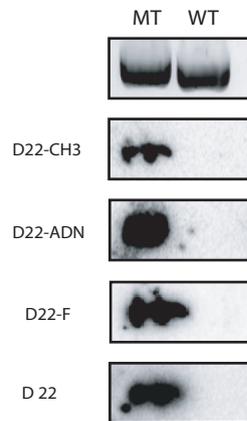
Outre l'augmentation de la stabilité des ARN recombinants dans les cellules, les modifications chimiques introduites au niveau des inserts avaient également pour but d'augmenter la stabilité des hybrides ARN/ADNmt. Les température de fusion des inserts à l'ADN ont été évaluées de façon empirique par spectrophotométrie aux UV dans le laboratoire D. Pyshnyi et sont représentées en **figure 42**. Il est intéressant de noter que la température de l'insert non modifié de D22 (50°C) a une température de fusion proche de celle qui avait été estimée dans le paragraphe II.1.1 des résultats (53,2°C). On peut également remarquer que, contrairement à ce qu'il est généralement admis, l'hybride ADN/ADN est ici plus stable que l'hybride ARN/ADN.

Concernant l'effet de ces ARN modifiés sur le taux d'hétéroplasmie seul l'ARN D-ADN a permis d'obtenir une baisse de 20% du taux d'ADNmt muté 4 jours après la transfection (**Figure 43**). La présence de la thymidine inversée en 3' semble avoir un effet inhibiteur, l'ADN D22-ADNT n'ayant quant à lui aucun effet sur l'hétéroplasmie. L'ensemble de ces résultats s'avère donc décevant. Bien que les ARN modifiés soient plus stables que leur homologue non modifié D22 et que leurs inserts possèdent une T<sub>m</sub> plus élevée, ils ne permettent non seulement pas de stabiliser l'effet sur l'hétéroplasmie mais semblent l'inhiber. Les modifications augmentant la température de fusion à l'ADN, il pourrait être possible que la moitié de l'insert puisse s'hybrider à l'une ou l'autre des bornes de la délétion dans l'ADNmt sauvage, inhibant de ce fait également sa répllication. Ceci a été testé sur Southern en hybridant dans des conditions pseudo-physiologiques les ARN recombinants à des produits de PCR contenant une ou deux bornes de la délétion (**Figure 44**).



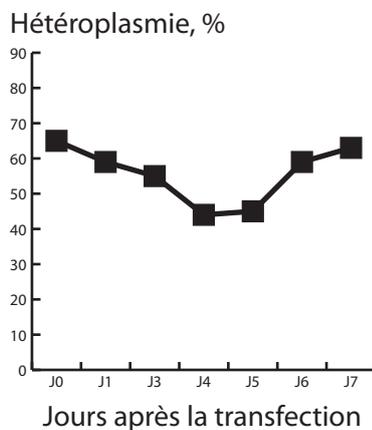
**Figure 43 : Analyse de l'effet des ARN recombinants modifiés sur le taux d'hétéroplasmie.**

Le tracé rouge correspond à l'effet de l'ARN FD22-ADN, le gris à l'ARN D22 et le tracé noir à l'effet des autres ARN modifiés.



**Figure 44: Vérification de la spécificité d'hybridation des ARN recombinants à l'ADNmt délété.**

Hybridation sur Southern des ARN recombinants (indiqués à gauche du gel) à un produit de PCR WT contenant une borne de la délétion et à un produit de PCR MT contenant les deux bornes de la délétion.



**Figure 45: Effet de la transfection des ARN D22-ADN et FD-H sur le taux d'hétéroplasmie.**

Les résultats démontrent cependant que dans les conditions utilisées, les ARN modifiés sont capables de discriminer l'ADNmt sauvage de l'ADNmt délété. Cela n'exclut toutefois pas la possibilité d'un manque de discrimination *in vivo*, qui pourrait de plus être dû non pas à l'augmentation de Tm de l'insert mais à une concentration trop élevée d'ARN recombinant dans les mitochondries. Une inhibition de la réplication l'ADNmt sauvage de 10% avait ainsi été obtenue *in vitro* pour un ratio de 50 molécules d'ARN par molécule d'ADN. Le test d'importation des ARN D22-CH3 et CH3T ayant montré que ces ARN étaient présents en quantité 2 à 3 fois supérieure à celle des ARN D22-ADN et D22, il pourrait par conséquent être possible que cela explique leur manque d'effet sur l'hétéroplasmie. Une seconde raison qui pourrait expliquer cette absence d'effet est que les modifications puissent rendre l'insert moins flexible et qu'il ait plus de difficultés à accéder à l'ADNmt. C'est pourquoi seul l'ARN D-ADN ayant un insert « naturel » composé de desoxynucléotides entraînerait une baisse du taux d'hétéroplasmie.

Finalement, l'ARN D22-ADN étant le seul à induire une baisse du taux d'ADNmt muté et ce dès le quatrième jour suivant la transfection (au lieu de 5 pour l'ARN D22 et de 6 pour l'ARN FD-L) il a donc été testé en combinaison de l'ARN FD-H pour tenter d'améliorer l'effet observé sur l'hétéroplasmie. Les résultats obtenus sont toutefois similaires à ceux obtenus lorsque les cellules sont transfectées avec deux ARN FD-L et FD-H à la fois (**Figure 45**).

## **IV Résultats non associés au projet de thèse**

Lors de mon stage de master, j'ai pu participer à la caractérisation des facteurs d'import de l'ARNr 5S dans les mitochondries humaines. Ces travaux m'ont permis de me familiariser avec les tests d'import *in vitro* et *in vivo* utilisés pendant ma thèse et ont abouti à l'identification de la rhodanèse, une sulfurtransferase mitochondriale, capable de former un complexe avec l'ARNr 5S et nécessaire à son import.

**Article n°3**

**Mitochondrial enzyme rhodanese is essential for 5S ribosomal RNA import into human mitochondria.** Smirnov A, Comte C, Mager-Heckel AM, Addis V, Krasheninnikov IA, Martin RP, Entelis N, Tarassov I. J Biol Chem. 2010 Jul 27.



# Mitochondrial Enzyme Rhodanese Is Essential for 5 S Ribosomal RNA Import into Human Mitochondria\*

Received for publication, June 3, 2010, and in revised form, July 16, 2010. Published, JBC Papers in Press, July 27, 2010, DOI 10.1074/jbc.M110.151183

Alexandre Smirnov<sup>‡§</sup>, Caroline Comte<sup>‡</sup>, Anne-Marie Mager-Heckel<sup>‡</sup>, Vanessa Addis<sup>‡</sup>, Igor A. Krasheninnikov<sup>§</sup>, Robert P. Martin<sup>‡</sup>, Nina Entelis<sup>‡</sup>, and Ivan Tarassov<sup>‡1</sup>

From the <sup>‡</sup>Department of Molecular and Cellular Genetics, UMR 7156, CNRS-University of Strasbourg, Strasbourg 67084, France and the <sup>§</sup>Department of Molecular Biology, Biology Faculty, Moscow State University, Moscow 119992, Russia

5 S rRNA is an essential component of ribosomes. In eukaryotic cells, it is distinguished by particularly complex intracellular traffic, including nuclear export and re-import. The finding that in mammalian cells 5 S rRNA can eventually escape its usual circuit toward nascent ribosomes to get imported into mitochondria has made the scheme more complex, and it has raised questions about both the mechanism of 5 S rRNA mitochondrial targeting and its function inside the organelle. Previously, we showed that import of 5 S rRNA into mitochondria requires unknown cytosolic proteins. Here, one of them was identified as mitochondrial thiosulfate sulfurtransferase, rhodanese. Rhodanese in its misfolded form was found to possess a strong and specific 5 S rRNA binding activity, exploiting sites found earlier to function as signals of 5 S rRNA mitochondrial localization. The interaction with 5 S rRNA occurs cotranslationally and results in formation of a stable complex in which rhodanese is preserved in a compact enzymatically inactive conformation. Human 5 S rRNA in a branched Mg<sup>2+</sup>-free form, upon its interaction with misfolded rhodanese, demonstrates characteristic functional traits of Hsp40 cochaperones implicated in mitochondrial precursor protein targeting, suggesting that it may use this mechanism to ensure its own mitochondrial localization. Finally, silencing of the rhodanese gene caused not only a proportional decrease of 5 S rRNA import but also a general inhibition of mitochondrial translation, indicating the functional importance of the imported 5 S rRNA inside the organelle.

5 S rRNA is a highly conserved essential component of large ribosomal subunits of all living organisms, the only exceptions being mitochondria of some protists, yeast, and mammals where 5 S rRNA is not encoded by mtDNA nor was it detected in mitoribosomes (1). This ~120-nucleotide-long RNA molecule is distinguished by complex structural organization (for review see Ref. 2) as well as by its crucial role in translation (3). But one of the most striking features of eukaryotic 5 S rRNA is the unusual scheme of their intracellular transport. Synthesized

outside the nucleolus by RNA polymerase III, they take a special export/re-import pathway to reach and complement nascent large ribosomal subunits (4, 5). Although this pathway was described in detail only in *Xenopus* oocytes, the data exist that quite a similar scheme of intracellular movements may be found in mammalian somatic cells; thus, it appears to be common for all vertebrates (6, 7).

Surprisingly, an interesting bypass from this circuit was reported in mammals: a portion of cytoplasmic 5 S rRNA pool was found to be redirected into the mitochondrial matrix (8–10). Neither mechanism of this interception nor the function of 5 S rRNA inside mitochondria is understood. Although basic requirements for the 5 S rRNA import resemble those for internalization of mitochondrial precursor proteins (dependence on ATP hydrolysis, electrochemical potential across the inner membrane, and functional pre-protein import apparatus), the former mechanism stands apart because of the different nature of the imported molecule and the necessity of some unknown cytosolic protein factors (10). In our recent study (11), two distinct structural elements of 5 S rRNA were identified as signals of its mitochondrial localization (Fig. 1A). We suggested that these import determinants correspond to binding sites with protein factors responsible for the mitochondrial targeting of 5 S rRNA. It was also hypothesized that 5 S rRNA, once exported from the nucleus, becomes a target of competition between two pathways. The first pathway functions through binding to the ribosomal protein L5, which carries the RNA into the nucleolus where both of them become incorporated into nascent ribosomal particles (5). The second pathway is ensured by import factors that address 5 S rRNA into mitochondria (11). Thus, understanding how the intracellular distribution of 5 S rRNA is regulated requires characterization of the protein factors directing its mitochondrial import.

In this work, we identify one of these factors as mitochondrial thiosulfate sulfurtransferase, rhodanese (EC 2.8.1.1), a member of a vast protein superfamily with very diversified functions (12). We found that rhodanese binds to 5 S rRNA cotranslationally to form a tight complex where the protein is preserved in its enzymatically inactive conformation. Upon this interaction, 5 S rRNA shows certain functional traits characteristic of Hsp40-type cochaperones involved in mitochondrial precursor targeting. Because only one particular conformation of 5 S rRNA was found to possess such an activity, an elegant 5 S rRNA import mechanism based on a series of reciprocal chaperone events can be proposed. Identification of rhodanese as a 5 S rRNA import factor provided us with a tool to demonstrate,

\* This work was supported by the CNRS, Université de Strasbourg, Moscow State University, Association Française Contre les Myopathies, Agence Nationale de la Recherche, Fondation pour la Recherche Médicale, Russian Foundation for Basic Research, and ARCUS (cooperation program Alsace-Russia-Ukraine).

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed: UMR 7156 CNRS-UDS, 21 Rue René Descartes, 67084 Strasbourg, France. Fax: 33-3-8841-7070; E-mail: i.tarassov@unistra.fr.

for the first time, the functional significance of the 5 S rRNA import for translational activity of mammalian mitochondria.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

**Fractionation of Total Protein Extract of Human Cells**—HepG2 cells grown on the standard DMEM (13) were resuspended in a small volume of the NPMD buffer (20 mM sodium/phosphate buffer, pH 6.5, 150 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 5 mM dithiothreitol, 0.2 mM PMSF, 1× proteinase inhibitor mixture; Roche Applied Science) and disrupted by sonication on ice. The resulting lysate was cleared twice at 16,000 × *g* for 10 min. 0.1% polyethyleneimine (pH 6, adjusted with HCl) was added to the supernatant to remove nucleic acids, and the supernatant was incubated on ice for 20 min and then centrifuged for 30 min at 16,000 × *g*. The resulting supernatant was subjected to the differential (0–25, 25–50, 50–65, and 65–80%) ammonium sulfate precipitation. The pellets were collected by centrifugation at 16,000 × *g* for 20 min, dialyzed overnight against the NPMD buffer, and filtered through 0.45-μm bacterial filters. The 25–50% (50AS) and the 65–80% (80AS) fractions were further subjected to gel filtration on HiPrep 16/60 Sephacryl S-200 high resolution. The column was pre-equilibrated with TBS buffer (50 mM Tris-HCl, pH 8, 150 mM NaCl). Fractions active in *in vitro* 5 S rRNA import assays were then loaded on the HiTrap Mono Q column (elution with 20 mM Tris-HCl, pH 7, 0.2 mM PMSF, and the linear NaCl gradient from 0 to 3 M). Resulting active fractions were analyzed by affinity chromatography on heparin-Sepharose (10 mM sodium/phosphate buffer, pH 7, 50 mM NaCl, elution with the linear NaCl gradient from 50 to 1500 mM).

**5 S rRNA Construction**—All the 5 S rRNA versions used are described in detail in Ref. 11. Corresponding PCR-generated genes were transcribed *in vitro* using the T7 RiboMAX Express large scale RNA production system (Promega), and the resulting transcripts were purified by denaturing gel electrophoresis.

**Import of 5 S rRNA into Isolated Human Mitochondria**—Human mitochondria were isolated from HepG2 cells as described previously (10, 14). The standard RNA import assay was performed as described previously (10). For this, mitochondria were incubated in the Import Mix (0.6 M sorbitol, 20 mM Hepes-KOH, 20 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ATP, 5 mM dithiothreitol, 0.5 M phosphoenol pyruvate, pH 7.5) with [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-labeled 5 S rRNA in the presence of HepG2 cytosolic protein fractions and/or purified rhodanese at 37 °C for 10 min. Non-imported RNAs were digested with RNase A; mitochondrial RNAs were isolated and imported RNAs detected by denaturing PAGE followed by Typhoon-Trio (GE Healthcare) scanning and quantification. 1–5% of 5 S rRNA taken into the assay (“input”) were run in parallel for calculation of import efficiency. In all experiments, negative controls without mitochondria or proteins were performed. In some experiments, cytosolic protein preparation was preincubated with anti-rhodanese or anti-ALDH2 polyclonal rabbit antibodies (Santa Cruz Biotechnology) at 4 °C for 30 min.

**Northwestern Blotting**—5–10 μg of proteins were resolved by SDS-PAGE and electrotransferred on a nitrocellulose membrane. The membrane was then incubated in 0.1 M Tris-HCl, 20 mM KCl, 2.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Nonidet P-40, pH 7.5, at 4 °C for 1 h, washed several times with the same solution, and blocked in

10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 5 mM Mg(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>, 2 mM dithiothreitol, 5% BSA, 0.01% Triton X-100 for 5 min at 4 °C. Hereafter, the membrane was incubated at 37 °C for 2 h in the Import Mix containing 1 nM [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP-labeled human 5 S rRNA. The membrane was then washed with the Import Mix without 5 S rRNA and autoradiographed using the PhosphorImager system (Fuji). The corresponding bands on the SDS gel were excised and analyzed by MALDI-TOF/Mascot.

Silencing of rhodanese genes was ensured by two consecutive transfections of HepG2 cells spaced by 3 days with a mixture of three cognate siRNAs (Santa Cruz Biotechnology) in accordance with the manufacturer’s protocol. For control, cells were transfected with siRNA against luciferase mRNA, as described previously (15), or mock-transfected. Both transfected and mock-transfected cells were analyzed for rhodanese expression 3 and 13 days after the second transfection by Western blotting with rhodanese-directed polyclonal rabbit antibodies (Santa Cruz Biotechnology). Mitochondria were isolated and purified as described previously (14) and treated with RNase A and digitonin to remove nonspecifically attached RNAs. Total and mitochondrial RNAs were isolated with TRIzol reagent (Invitrogen) and analyzed by Northern blot hybridization.

For respiration tests, 10<sup>3</sup> of wild-type or siRNA-transfected cells were grown in parallel in DMEM or in DMEM where glucose was replaced by galactose (4 g/liter). Cells were periodically detached from the wells and counted in a standard hemocytometer chamber, and the number of living cells was controlled with trypan blue.

Analysis of products of mitochondrial translation in human cells was performed as described previously (15). For this, 0.5 × 10<sup>6</sup> semi-confluent cells were preincubated at 37 °C for 5 min in DMEM containing 0.5% dialyzed calf serum without methionine with 0.2 g/liter emetine, and 200 mCi/liter [<sup>35</sup>S]methionine was then added (>1000 Ci/mmol, Amersham Biosciences) and incubated for 30 min. Finally, 0.1 mM nonlabeled methionine was added to the medium and incubated for 10 min. Cells were then disrupted, and the translation products were analyzed by 10–20% gradient SDS-PAGE followed by autoradiography.

**Rhodanese Manipulations**—Bovine liver rhodanese (Sigma) was stored in 50 mM Tris-HCl, 20 mM dithiothreitol, 50 mM sodium thiosulfate, pH 7, at –80 °C.

Urea-denatured rhodanese was prepared as described previously (16). For this, the solution of the native enzyme (5 g/liter) was diluted with 3 volumes of 8 M urea, 150 mM KCl, 24 mM NaCl, 10 mM dithiothreitol in 1× TBE buffer and incubated at 25 °C for 1 h. The residual enzymatic activity was not higher than 4%.

The aggregation assay was performed as described previously (16). For this, 6 μl of urea-denatured rhodanese were rapidly diluted in 100 μl of 100 mM HEPES-NaOH, 150 mM KCl, 24 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 7 (pre-equilibrated at 25 °C for 5 min), containing as additives various 5 S rRNA versions or other nucleic acids, and thoroughly mixed for exactly 15 s. Immediately, the kinetics of absorbance at 320 nm (reflecting growth of turbidity caused by large aggregates) was chased.

The reactivation of urea-denatured rhodanese was carried out as described previously (17). For this, denatured rhodanese was diluted with 200 mM β-mercaptoethanol, 50 mM Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,

## Rhodanese Directs 5 S rRNA Mitochondrial Import

50 mM Tris-HCl, pH 7.8, to a concentration of 3.6 mg/liter and incubated at 25 °C. Aliquots of the reaction mixture were taken for enzymatic activity measurements. The activity of the equivalent amount of the native enzyme was taken as 100%.

Measurement of enzymatic activity (catalysis of sulfur transfer from thiosulfate to cyanide, followed by formation of the complex between  $\text{Fe}^{3+}$  and thiocyanate produced in the reaction to develop the coloration): 3–10  $\mu\text{l}$  of rhodanese-containing solution were mixed with 100  $\mu\text{l}$  of freshly prepared buffer, composed of 40 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 25 mM  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ , 50 mM KCN, and incubated at 25 °C for 10 min. The reaction was stopped by addition of 50  $\mu\text{l}$  of 18% formaldehyde. Coloration was developed by mixing with 150  $\mu\text{l}$  of freshly prepared reagent, containing 66.7 g/liter  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ , 8.67%  $\text{HNO}_3$ , and measured at 460 nm in 1-cm cuvettes. Thermo-inactivation of rhodanese was followed at 25 °C in 50 mM Tris-HCl, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , pH 7.8, with final rhodanese concentration at 10 mg/liter.

UV absorbance spectra measurements were carried out with the NanoDrop-1000 (LabTech). For this, 0.25  $\mu\text{M}$  rhodanese solutions in the buffer, containing 0.21 M sorbitol, 7 mM HEPES-KOH, 7 mM KCl, 0.875 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.35 mM ATP, 1.75 mM dithiothreitol, 0.175 mM phosphoenolpyruvate, pH 7.5, + 0.05 $\times$  phosphate buffer (Sigma) + 0.15 $\times$  TBE buffer, were used. The denatured enzyme was diluted in the buffer to make the final concentrations of all components equal for all samples (the final concentration of urea being 1.25 M). All spectra were read against identical protein-free controls, in 20 s after beginning of aggregation (early stage) and in 15 min (aggregation completed). Mitochondrial import assay of  $^{35}\text{S}$ -labeled rhodanese synthesized in rabbit reticulocyte lysate was performed as described previously (18).

**Electrophoretic Mobility Shift Assay**—1–10 nM purified  $^{32}\text{P}$ -labeled RNA was denatured at 100 °C in the presence of either 1 mM EDTA or 5 mM  $\text{MgCl}_2$  and then slowly cooled down to 25 °C. It was then incubated with rhodanese in the Import Mix for 10–15 min. Resulting complexes were analyzed by electrophoresis in 8% PAAG,<sup>2</sup> 0.5 $\times$  TBE, 5% glycerol in 0.5 $\times$  TBE buffer at 10 V/cm at 4 °C followed by Typhoon-Trio (GE Healthcare) scanning and quantification. The standard Scatchard plot construction and analysis were described previously (19). Because the resulting curves are concave (indicating the presence of several binding sites, a consequence of the complex mixture of rhodanese forms produced after urea dilution (17, 20)), only estimation of average dissociation constants was performed.

Cotranslational binding of 5 S rRNA to rhodanese was studied as described previously (21). Human rhodanese cDNA was kindly provided by F. Broly. Synthesis of [ $^{35}\text{S}$ ]Met-labeled human rhodanese was carried out in TNT T7 Quick for PCR DNA (Promega) according to the manufacturer's protocol. 10  $\mu\text{M}$  human 5 S rRNA labeled with ChromaTide Alexa Fluor 488-5-UTP (Invitrogen) was added to the translation mixture at the very beginning of synthesis (for cotranslational binding) or in 70 min after launching translation (post-translational bind-

ing). Translation products were analyzed by SDS gel and by native gradient 4–10% PAAG, 0.5 $\times$  TBE, 0–30% glycerol electrophoresis (10 V/cm, 4 °C). Both RNA and protein signals were measured with Typhoon-Trio scanner.

**Native PAGE of 5 S rRNA**—T7 transcripts were purified on denaturing gel to homogeneity. 0.1–0.2  $\mu\text{g}$  of the RNA was incubated at 100 °C for 1 min in 10  $\mu\text{l}$  of either 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (to obtain 5 S rRNA<sup>Mg</sup>) or 1 mM EDTA (to obtain 5 S rRNA<sup>EDTA</sup>). Then the RNA was renatured by slow cooling down to 25 °C, mixed with 2  $\mu\text{l}$  of 0.25% bromophenol blue, 0.25% xylene cyanol, 30% glycerol, and loaded on native 8% PAAG in 1 $\times$  TBE buffer. Samples were run at 10 V/cm until the bromophenol blue was out. Positions of RNA bands were visualized by ethidium bromide staining.

**In-gel Förster Resonance Energy Transfer (FRET)**—Human 5 S rRNA was preassembled from three oligoribonucleotides (Integrated DNA Technologies) in a way that the extremity of the  $\beta$ -domain carried a Cy-3 moiety; the extremity of the  $\gamma$ -domain was labeled with fluorescein (Fig. 5B) and that of the  $\alpha$ -domain bore the [ $^{32}\text{P}$ ]phosphate. Both fluorophores were attached to CC-dinucleotides; this environment was optimal for their mobility (22). Annealing was performed in two steps as follows: (i) oligonucleotides “2” and “3” (see Fig. 5, B and C) (0.4  $\mu\text{M}$  each) were heated together to 85 °C in 40 mM NaCl, 0.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , or 1 mM EDTA and then left to cool down slowly to 50 °C; (ii) the resulting mixture was added to 1  $\mu\text{M}$  oligonucleotide “1” (see Fig. 5, B and C), heated to 60 °C, and left to cool down slowly overnight. Forms obtained either in the presence (5 S rRNA<sup>Mg</sup>) or in the absence (5 S rRNA<sup>EDTA</sup>) of  $\text{Mg}^{2+}$  were run in parallel in 8% PAAG, 0.5 $\times$  TBE, 200 V at 4 °C, and then their fluorescent (fluorescein, excitation at 488 nm/emission at 520 nm; cyanin-3, excitation at 532 nm/emission at 580 nm) and radioactive ( $^{32}\text{P}$ ) signals were measured with the use of a Typhoon (Amersham Biosciences) in wet gel and quantified with ImageQuant<sup>TM</sup>. 5 S rRNA preassembled from the same oligonucleotides but without any fluorescence acceptor on the  $\beta$ -domain was used as control. The FRET efficiency ( $E$ ) was calculated by fluorescein quenching, with the use of linearization of the standard Equation 1,

$$\frac{\text{Ida}[\text{d}]}{[\text{da}]} = \text{Id}(1-rE) \quad (\text{Eq. 1})$$

where  $\text{Ida}$  and  $\text{Id}$  are fluorescein fluorescence intensities in 5 S rRNAs with both donor and acceptor, and with donor alone, respectively;  $[\text{da}]$  and  $[\text{d}]$  are radioactive signals of 5 S rRNAs with both donor and acceptor, and with donor alone, respectively,  $r$  indicates efficiency of labeling with the donor fluorophore ( $r = 1$ , in our case). The distance between fluorophores ( $R$ ) was calculated from Equation 2,

$$R = R_0 \left( \frac{1}{E} - 1 \right)^{\frac{1}{6}} \quad (\text{Eq. 2})$$

where  $R_0$  indicates the Förster critical distance (for the pair fluorescein/cyanin-3 under these conditions it is usually  $\sim 56$  Å; see for example Ref. 23).

<sup>2</sup> The abbreviation used is: PAAG, polyacrylamide gel.

## RESULTS

**Import of 5 S rRNA into Isolated Human Mitochondria Necessitates at Least Two Protein Factors**—To search for proteins involved in the 5 S rRNA mitochondrial import, the total HepG2 cell protein extract was subjected to multistep fractioning (Fig. 1B). On every step, resulting fractions were tested for their capacity to direct import of radioactively labeled 5 S rRNA into isolated HepG2 mitochondria. None of the separate fractions was found to be import-competent. In contrast, 5 S rRNA readily accumulated in mitochondria when a particular combination of two distinct fractions was used (Fig. 1C), suggesting requirement of at least two soluble proteins for 5 S rRNA import into the organelles.

**Rhodanese as a 5 S rRNA Import Factor**—Because RNA import factors are assumed to recognize and to associate with their cargo, we checked the presence of 5 S rRNA-binding proteins in one of the final active fractions (14H/50AS) by Northwestern analysis (Fig. 1D). Two major proteins of ~34 and ~55 kDa were revealed. Among candidates identified in this fraction by MALDI-TOF/MS (Table 1), a 33.4-kDa enzyme, thiosulfate sulfurtransferase (rhodanese), was the best scored. The other protein able to interact with 5 S rRNA is probably another mitochondrial enzyme, aldehyde dehydrogenase or its cytosolic precursor.

Rhodanese appeared to be of great interest because it is known to be synthesized on free cytosolic ribosomes and then imported into mitochondria (24, 25). Rhodanese homology superfamily embraces proteins involved in diverse processes, including cyanide detoxication, Fe/S cluster formations, and other redox reactions as well as intracellular transport and regulatory pathways (12). Thus, rhodanese seemed to be a valuable candidate for the role of 5 S rRNA mitochondrial import factor. To check this possibility, we performed a series of *in vitro* import assays, where purified bovine liver rhodanese (89.6% identical to the human one), combined with the 80AS fraction, was shown to be as active in directing 5 S rRNA into human mitochondria as the whole fraction 14H/50AS (Fig. 1E). The 5 S rRNA import efficiency increased in a saturable manner upon growth of rhodanese concentration, and vice versa, preincubation of the cytosolic protein extract with anti-rhodanese antibodies led to a significant decrease or even total loss of its ability to direct the import (Fig. 1, F and G). In the same experiment, antibodies specific to another putative 5 S rRNA-binding protein, aldehyde dehydrogenase, had no effect on the 5 S rRNA mitochondrial import (Fig. 1G). These data strongly suggest that rhodanese was indeed the 5 S rRNA import factor present in the 14H/50AS fraction.

**Inhibition of Rhodanese Expression Affects the 5 S rRNA Import into Human Mitochondria and Mitochondrial Translation *in Vivo***—To validate rhodanese as putative 5 S rRNA import factor *in vivo*, we studied dependence between the expression level of the protein and the amount of 5 S rRNA inside mitochondria in living human cells. For this, expression of rhodanese genes was inhibited by transient transfection of HepG2 cells with specific siRNAs, and the effect of this inhibition on the 5 S rRNA import was studied (Fig. 2, A and B). Strong correlation between the intracellular level of rhodanese

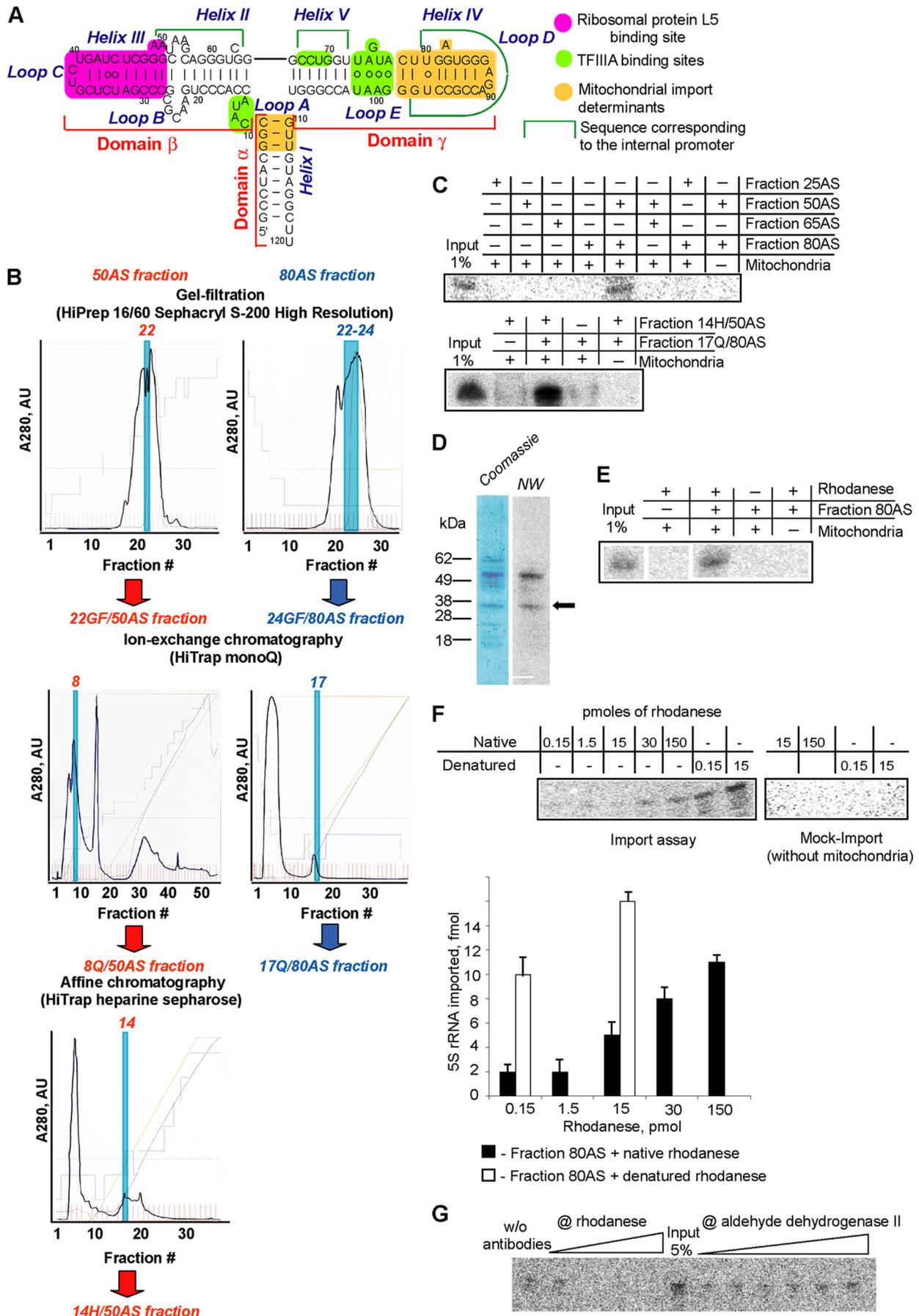
and the mitochondrial 5 S rRNA level was observed. The decrease of rhodanese expression led to a 4-fold drop of 5 S rRNA import (the minor amounts of remaining mitochondrial 5 S rRNA may reflect its longer turnover time than that of rhodanese). On the contrary, restoration of expression 13 days after transfection was marked by equally proportional growth of the 5 S rRNA level inside mitochondria. Neither transcription of mitochondrial DNA nor the overall cellular 5 S rRNA level was affected, indicating that the effect of the short term withdrawal of rhodanese on the 5 S rRNA import was specific. This result indicates that rhodanese is indeed essential for the 5 S rRNA import *in vivo*.

Intriguingly, those changes in the mitochondrial level of 5 S rRNA were found to be associated with proportional decrease/restoration of the general mitochondrial translational activity (Fig. 2C). Cells transfected with rhodanese mRNA-directed siRNAs also demonstrated significantly slower growth on the galactose-containing medium, indicating insufficient mitochondrial respiration activity (Fig. 2D). Because the function of rhodanese inside mitochondria does not seem to be associated with translation or formation of respiratory complexes (12), deletion of its putative orthologue (*YOR251c*) in yeast does not produce a respiration phenotype on galactose medium (26) (and, noteworthy, no 5 S rRNA import was found to exist in yeast cells (10)); this effect appears to be directly linked to the level of 5 S rRNA inside mitochondria. This is the first demonstration of functional importance of the imported 5 S rRNA for mitochondrial translation in mammalian cells.

**Misfolded Rhodanese Forms a Stable Complex with 5 S rRNA**—Until now, no data on RNA-binding properties of rhodanese have been reported. We proceeded with direct analysis of 5 S rRNA-rhodanese interaction, using the mobility shift assay. Surprisingly, only a weak association (apparent  $K_d > 35 \mu\text{M}$ ) of human 5 S rRNA with the native enzyme could be observed (data not shown). It is known that the *de novo* synthesized rhodanese, like most precursor proteins, is present in cytosol in an enzymatically inactive state with a changed conformation, and it acquires its activity only upon import into mitochondria (27–29). Therefore, we checked the misfolded rhodanese, obtained by denaturation with urea followed by dilution of the denaturant (16), and have found that it does bind 5 S rRNA specifically and with a very high affinity (apparent  $K_d$  value estimated by Scatchard analysis ~20 pM; Fig. 3, A–C). Furthermore, the misfolded rhodanese also proved to be significantly more active than the native one in the 5 S rRNA *in vitro* import assay (Fig. 1F).

Previously, we hypothesized that signals of mitochondrial localization of 5 S rRNA (Fig. 1A) may match its binding sites with import factors (11). This is why it was of particular interest to verify if they were involved in interaction with rhodanese. Indeed, deletion of the  $\gamma$ -domain site led to a dramatic (>200-fold) increase of the complex dissociation constant, whereas disruption of the  $\alpha$ -domain site resulted in almost total loss of binding capacity (Fig. 3, D and E). These data suggest that the  $\alpha$ -domain site functions as the main rhodanese-binding platform, whereas the  $\gamma$ -domain may contain a region of additional, less important contact needed for more tight binding. All the data show that rhodanese in its misfolded form recognizes par-

# Rhodanese Directs 5 S rRNA Mitochondrial Import

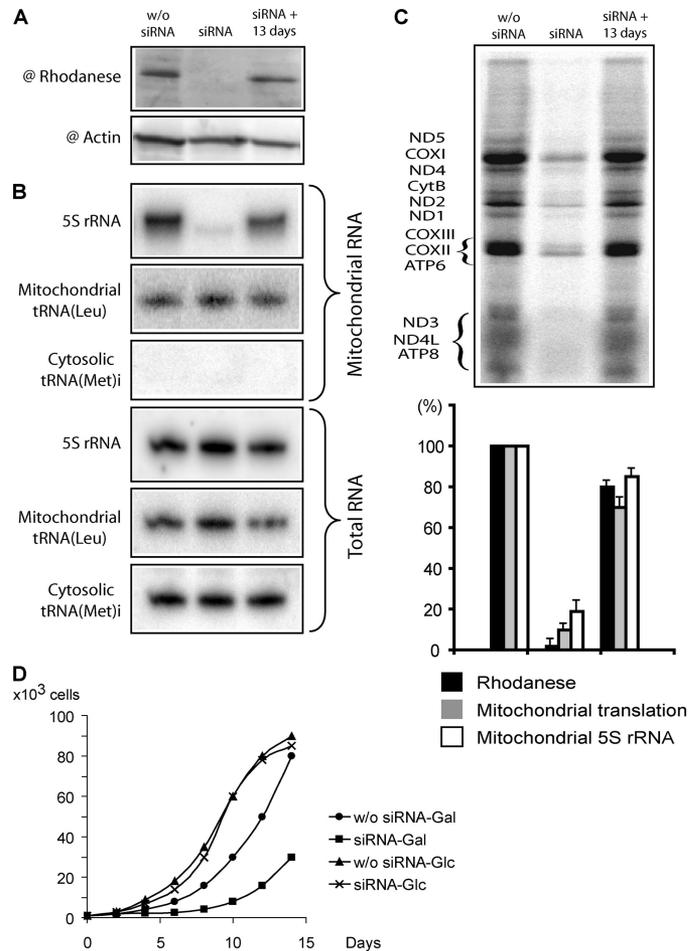


**TABLE 1**  
Protein components of the fraction 14H/50AS identified by MALDI-TOF/MS as putatively capable of 5 S rRNA binding

Protein	Mass	Localization	Probability-based Mowse score
	<i>kDa</i>		
Aldehyde dehydrogenase	55	Mitochondrial inner membrane	86
Precursor of aldehyde dehydrogenase	57	Cytosol (moves to mitochondria)	84
Annexin V	36	Cytosol, nucleus	60
Precursor of aldo-keto reductase 2	37	Cytosol (moves to mitochondria)	150
Regucalcin	34	Nucleus, cytosol	76
Rhodanese	33	Mitochondrial matrix, cytosol	185
Glutathione S-transferase	26	Cytosol	81

ticular sites of 5 S rRNA, needed for its mitochondrial localization, binds this RNA with high affinity, and thus can perform the function of 5 S rRNA carrier to mitochondria.

**Rhodanese Binds 5 S rRNA Cotranslationally**—The results above raised the question of physiologic relevance of 5 S rRNA interaction with misfolded rhodanese. One can expect that this kind of association may occur cotranslationally with the nascent protein. Indeed, it is known that rhodanese is bound by chaperones in a cotranslational manner, although it is still remaining in mainly an unfolded state, which can be critical for acquisition of its import-competent conformation (30). On the other hand, cotranslational binding of 5 S rRNA was demonstrated earlier as well: the ribosomal protein L5 synthesized in a mammalian *in vitro* translation system was found in the complex with 5 S rRNA only when the latter was present in the reaction medium from the very beginning of the assay (21). We performed a similar experiment to test the affinity of the *de novo* synthesized rhodanese to 5 S rRNA. For this, human <sup>35</sup>S-labeled rhodanese was synthesized in a rabbit reticulocyte lysate system in the presence of fluorescently labeled 5 S rRNA, and the products of translation were analyzed by native gel electrophoresis. 36 ± 2% of the newly synthesized protein was found associated with 5 S rRNA when the latter was added at the very beginning of the assay (Fig. 3F). In contrast, addition of 5 S rRNA after completion of rhodanese synthesis resulted in a significantly lower binding (10 ± 1%). A small but notable amount of rhodanese (6 ± 1%) was reproducibly found in complex with 5 S rRNA naturally present in the reticulocyte lysate, even if no additional 5 S rRNA molecules were introduced into the system. Noteworthy, this was the only rhodanese-RNA complex formed under these conditions; even addition of an excess of *Escherichia coli* tRNAs did not change this pattern (Fig. 3F). These data prove that nascent rhodanese can specifically bind to 5 S rRNA.

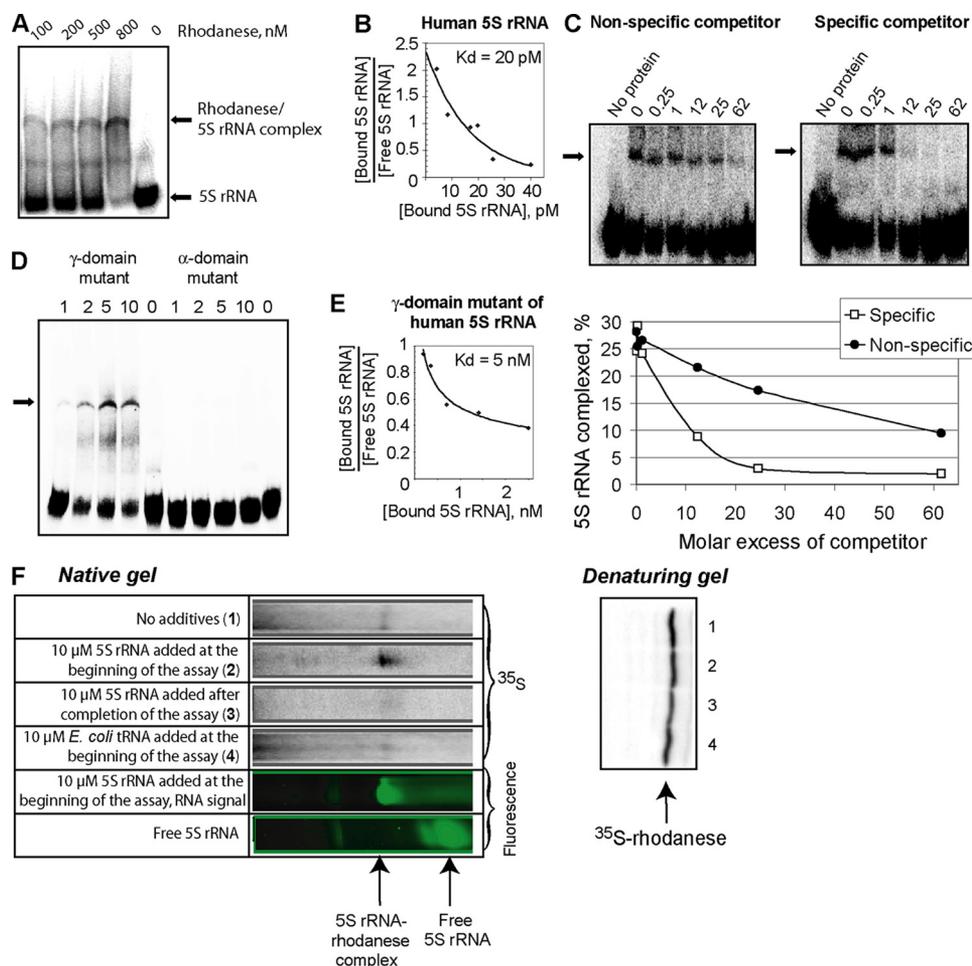


**FIGURE 2. Effect of rhodanese knockdown on the 5 S rRNA import into HepG2 mitochondria and mitochondrial translational activity.** The Western blot of total cellular protein extracts (A), the corresponding Northern blot of total and mitochondrial RNAs (B), and the autoradiography of SDS gels with mitochondrial translation products (C) are provided. *w/o siRNA*, mock-transfected cells (showed no difference from ones transfected with siRNA against luciferase mRNA, data not shown); *siRNA*, cells transfected with rhodanese mRNA-directed siRNAs; *siRNA + 13 day*, recovery of rhodanese expression 13 days after the 2nd transfection. The correlation between the rhodanese expression, the 5 S rRNA mitochondrial level, and the general mitochondrial translation level is presented in the histogram. The values in mock-transfected cells were taken as 100%. Error bars represent the result of two independent experiments. D, growth curves of cultures transfected with rhodanese mRNA-directed siRNAs or nontransfected HepG2 cells, grown on glucose (Glc) or galactose (Gal)-containing DMEM.

**5 S rRNA Functions as a Chaperone for Misfolded Rhodanese**—Cotranslational interaction of unfolded rhodanese with 5 S rRNA reveals an interesting parallel with the action of chaperone systems responsible for precursor protein binding and their preservation in an import-competent conformation (30–32).

**FIGURE 1. Identification of rhodanese as a factor of 5 S rRNA mitochondrial import.** A, secondary structure of human 5 S rRNA and its main functional sites (from Ref. 11). B, fractionation scheme used for purification and identification of 5 S rRNA mitochondrial import factors. Profiles of absorbance at 280 nm of fractions obtained in step-by-step fractionation of 25–50% (red) and 65–80% (blue) differential ammonium sulfate precipitation preparations of HepG2 proteins are presented. Fractions active in 5 S rRNA import into isolated human mitochondria in combination with their counterparts (50% fraction derivative + 80% fraction derivative) are highlighted. AU, absorbance units. C, imported into isolated human mitochondria, <sup>32</sup>P-labeled 5 S rRNA was detected by denaturing gel electrophoresis followed by Typhoon scanning. Import assays were performed in the presence of HepG2 protein fractions obtained by differential ammonium sulfate (AS) precipitation (upper panel) and by subsequent chromatography fractionation (lower panel). 5–10 μg of protein/assay were used. 1% of input corresponds to 5 fmol of labeled 5 S rRNA. D, separation of the 14H/50AS fraction by SDS-PAGE (Coomassie) and the corresponding autoradiography after incubation with <sup>32</sup>P-labeled 5 S rRNA as a probe for Northwestern (NW) analysis. The band corresponding to rhodanese is marked with an arrow. E, *in vitro* import of 5 S rRNA in the presence of purified rhodanese (15 pmol) and the 80AS fraction. F, dependence of the 5 S rRNA *in vitro* import on the presence of increasing amounts of native or urea-denatured rhodanese. G, inhibition of 5 S rRNA import into isolated human mitochondria by preincubation of total protein extract with increasing amounts of anti-rhodanese or anti-ALDH2 antibodies. *w/o*, without.

## Rhodanese Directs 5 S rRNA Mitochondrial Import



**FIGURE 3. Rhodanese-5 S rRNA interaction.** *A*, mobility shift assay of complexes formed by human 5 S rRNA with urea-denatured rhodanese. The major rhodanese-5 S rRNA complex is marked with an arrow. The additional band may correspond to a minor complex (which was not always observed). *B*, Scatchard plot estimation of the dissociation constant for the rhodanese-5 S rRNA complex. *C*, mobility shift assays of rhodanese-5 S rRNA complexes formed in the presence of either nonspecific (yeast tRNA) or specific (nonlabeled human 5 S rRNA) competitors. Molar excess of competitors is marked above the autoradiographies. *D*, mobility shift assays of misfolded rhodanese complexed with a  $\gamma$ -domain ( $\Delta(78-98)$ ) or an  $\alpha$ -domain ( $7G \rightarrow U, 8G \rightarrow A, \text{ and } 9C \rightarrow U$ ) mutants of human 5 S rRNA. The total concentrations of rhodanese (in  $\mu\text{M}$ ) are provided above. The major complex is marked with an arrow. *E*, Scatchard plot estimation of the dissociation constant for the complex of rhodanese with the  $\gamma$ -domain mutant of 5 S rRNA ( $\Delta(78-98)$ ). *F*, cotranslational binding of rhodanese to 5 S rRNA. The native gel (upper panel) shows the rhodanese-5 S rRNA complex formed during translation of rhodanese mRNAs in a rabbit reticulocyte system under various conditions. Uncomplexed rhodanese molecules remained on the top of the gel (data not shown). Lower panel, autoradiography of the same amounts of rabbit reticulocyte lysates separated by SDS-PAGE, showing the total amount of newly synthesized rhodanese.

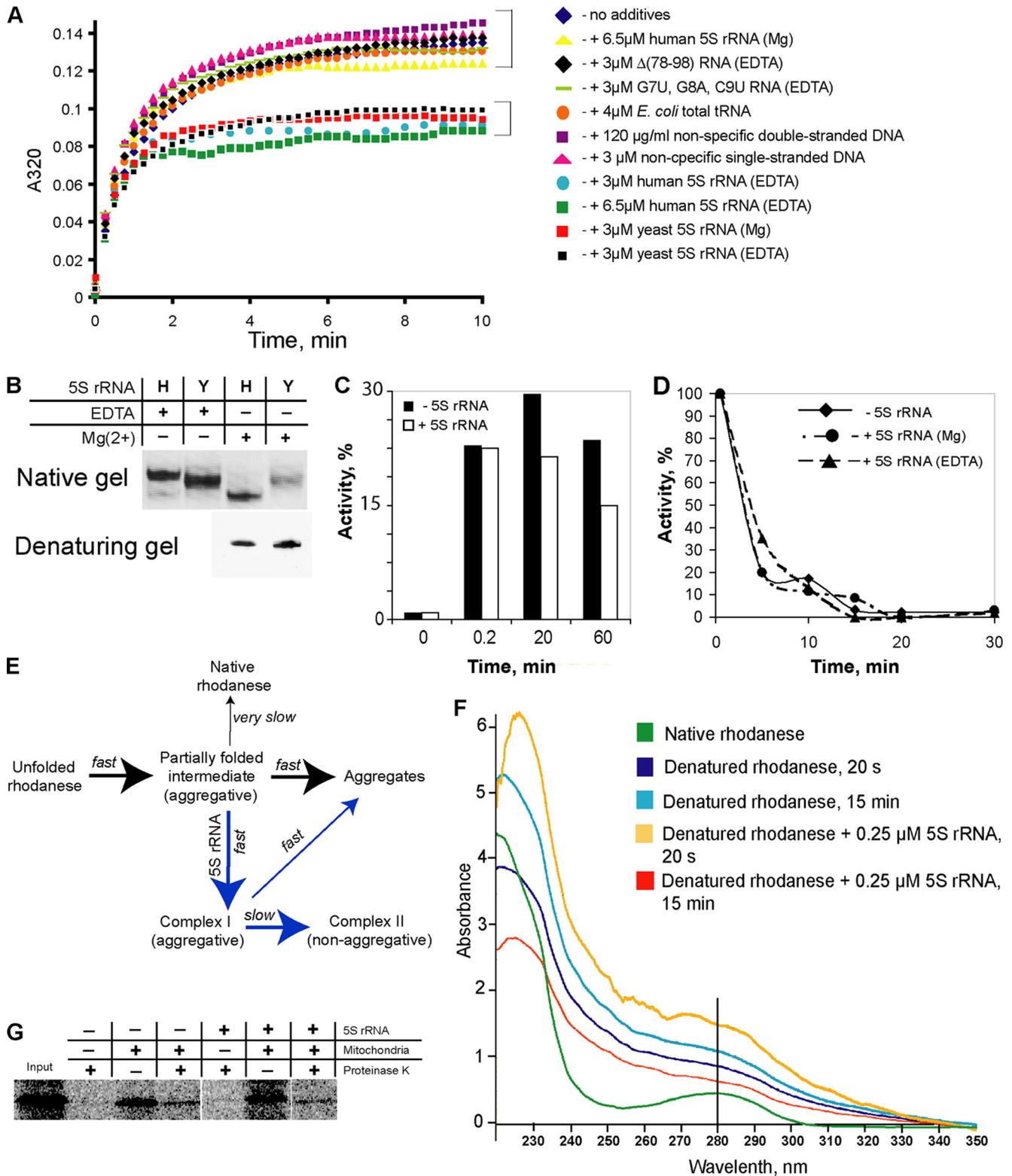
On the other hand, it was shown earlier that the interaction of 5 S rRNA with the L5 protein occurs through the mechanism of "mutual induced fit"; both partners confer to each other functional conformations and thus operate as reciprocal chaperones (33). Another example of 5 S rRNA-assisted refolding, concerning the DnaK protein, was recently demonstrated in a bacterial system (34). This is why we suggested that the 5 S rRNA molecule may perform the function of chaperone upon its interaction with rhodanese as well.

To verify this hypothesis, the standard aggregation assays (16) were performed (Fig. 4A). Urea-denatured rhodanese rapidly diluted in a buffer without the denaturant begins to aggregate due to stochastic collapsing of exposed hydrophobic surfaces, resulting in growth of turbidity of the solution. On the contrary, in the presence of a chaperone preventing such a reac-

tion, the process is suppressed. Because particular conformation is critical for activity of both RNA and protein chaperones (35-38), we tested two different forms of human 5 S rRNA, which can be obtained by refolding either in the presence (human 5 S rRNA<sup>Mg</sup>) or in the absence (human 5 S rRNA<sup>EDTA</sup>) of magnesium and distinguished by their mobility in native gel (Fig. 4B). Interestingly, addition of only one of them, 5 S rRNA<sup>EDTA</sup>, resulted in a significant suppression of rhodanese aggregation, the other form remaining completely inert (Fig. 4A). Thus, this chaperone action was found to be not only 5 S rRNA-specific (because nonspecific RNA or DNA molecules failed in this task; Fig. 4A) but also conformation-specific.

Noteworthy, both yeast 5 S rRNA forms (yeast 5 S rRNA<sup>Mg</sup> and yeast 5 S rRNA<sup>EDTA</sup>) demonstrate the mobility in native gel similar to that of human 5 S rRNA<sup>EDTA</sup> (Fig. 4B), suggesting that they acquire a closely related conformation. As expected, their addition to the aggregation assay resulted in an identical suppression curve (Fig. 4A). Human 5 S rRNA variants with mutations in rhodanese-binding sites (in  $\gamma$ - or  $\alpha$ -domains) were unable to suppress rhodanese aggregation even if folded in the absence of magnesium. This indicates that the observed chaperone effect was indeed dependent on specific 5 S rRNA binding to the misfolded rhodanese.

Intriguingly, the kinetics of rhodanese aggregation in the presence of human 5 S rRNA<sup>EDTA</sup> or yeast 5 S rRNA is far from being an ordinary one. Instead of a gradual slowdown without changes in the shape of the curve (indicating that rhodanese continues to aggregate even in the presence of a chaperone but with a lower rate), which is usually observed (39), in the presence of 5 S rRNA the curve becomes clearly biphasic. Its early segment corresponds to a rapid formation of aggregates upon dilution of the denaturant. Then, in 1.5-2 min, the aggregation stops abruptly without any significant growth of turbidity thereafter (Fig. 4A). This very particular pattern reflects aggregation associated with the refolding process (40). Although rhodanese is one of the most popular substrates for chaperone studies, only a few examples of such a kinetics have been reported to date. They concern the following cochaperones: mammalian and yeast DnaJ homologues Hdj1



**FIGURE 4. Chaperone activity of 5 S rRNA upon its interaction with misfolded rhodanese.** *A*, rhodanese aggregation assay in the presence of various nucleic acids. *B*, mobility of human (*H*) and yeast (*Y*) 5 S rRNAs in 8% 1 × TBE native gel. 5 S rRNAs were folded either in the absence of magnesium (1 mM EDTA) or in the presence of 5 mM MgCl<sub>2</sub>. *C*, time course reactivation of urea-denatured rhodanese in the absence and in the presence of 3 μM human 5 S rRNA<sup>EDTA</sup>. *D*, thermal inactivation of rhodanese in the absence of 5 S rRNA and in the presence of 3 μM 5 S rRNA<sup>EDTA</sup> or 5 S rRNA<sup>Mg</sup>. *E*, scheme describing behavior of urea-denatured rhodanese in a solution without denaturant (e.g. in the aggregation assay, see *A*) in the absence (*black arrows*) and in the presence (*blue arrows*) of human 5 S rRNA<sup>EDTA</sup> (developed from Refs. 17, 20). *F*, UV spectra of rhodanese (0.25 μg/μl) in native, urea-denatured, and 5 S rRNA-complexed forms, 20 s and 15 min after beginning of aggregation. *G*, import of rhodanese into isolated human mitochondria. <sup>35</sup>S-labeled proteins were synthesized in the cell-free PCR-optimized TNT system (Promega) either in the absence or in the presence of 4 μM human 5 S rRNA<sup>EDTA</sup>. Rhodanese does not demonstrate visible mobility shift upon import, because no cleavage of its mitochondrial transport signal occurs (24).

Downloaded from www.jbc.org at Universite Louis Pasteur, on October 4, 2010

## Rhodanese Directs 5 S rRNA Mitochondrial Import

and Hdj2 (41, 42), hTid-1<sub>L</sub> and hTid-1<sub>S</sub> (43), Ydj1p (44), and a *Caenorhabditis elegans* p97 homologue CDC48.2 (45). All of them were found to function as cochaperone components in Hsp40/Hsp70 systems, which are thought to be the first chaperones to bind to nascent proteins and preserve them in a misfolded but refolding-competent state (46–48). We found that the same is true for human 5 S rRNA<sup>EDTA</sup>, because it does not support reactivation of denatured rhodanese nor prevents the native protein from thermal inactivation (Fig. 4, C and D). These data suggest that human 5 S rRNA folds aggregation-prone rhodanese species into a nonaggregative but enzymatically inactive conformation, quite like known protein cochaperones (Fig. 4E).

This conclusion is strongly supported by analysis of UV spectra of rhodanese on different steps of the aggregation process (Fig. 4F), revealing parallels with the mechanism proposed earlier for the classic cochaperone action (46, 47). Rhodanese has 8 Trp and 8 Tyr residues mostly buried in the depth of the native globula (49). This is why its UV spectrum is particularly sensitive to any conformational changes (Fig. 4F). Thus, the urea-denatured form in 20 s after dilution in urea-free buffer (corresponding mostly to the first partially folded intermediate formed; Fig. 4E) shows significant hyperchromatism and a very particular filling of the absorption gap around 250 nm. This pattern becomes even more pronounced on the late stages of the aggregation process, which indicates that the molecule is extensively destructured. The behavior of the spectrum in the presence of human 5 S rRNA<sup>EDTA</sup> is dramatically different. The first phase (the rapid formation of aggregates; Fig. 4A) is marked with even higher hyperchromatism, suggesting that rhodanese is being preserved in almost a totally unfolded state, and does not collapse spontaneously (corresponds to *Complex I* on Fig. 4E). At the second phase (arrested aggregation; Fig. 4A), it acquires a very compact conformation that somewhat combines the features of both native and denatured states (corresponds to *Complex II* on Fig. 4E). All these data indicate that in the complex with 5 S rRNA rhodanese achieves a compact, nonaggregative state, which can still be clearly distinguished from the native conformation (Fig. 4E).

Taken together, these results enable us to conclude that a kind of functional mimicry of the protein cochaperone system by the 5 S rRNA molecule is manifested upon its interaction with rhodanese. Interestingly, specific interaction between bacterial 5 S rRNA and an Hsp70 (DnaK) has been reported (34, 50), continuing this intriguing comparison. Taking into account that the Hsp40/Hsp70 system was shown to be involved in the protein precursor import into mitochondria (51, 52), it appears probable that 5 S rRNA may thus exploit this pathway for its own targeting to mitochondria. Noteworthy, the contrary is not true because import of rhodanese into mitochondria was found to be independent of the 5 S rRNA concentration (Fig. 4G), and its targeting to the mitochondrial surface thus can be ensured by standard protein chaperone systems.

**In-solution Conformations of Human 5 S rRNA**—Only one form of human 5 S rRNA (5 S rRNA<sup>EDTA</sup>) was shown to possess a cochaperone-like activity upon its interaction with rhodanese (Fig. 4A). Although a more branched conformation can be expected for this form, regarding its slower mobility in native

gel (Fig. 4B), its precise nature remains still enigmatic. It was suggested previously that such large scale conformational shifts of 5 S rRNA are likely to be associated with the loop A rearrangement (53–55). The loop A, being a three-way junction (Fig. 1A), defines the stacking mode of the three domains of the molecule, and thus it is above all responsible for the tertiary structure of 5 S rRNA (56). For 5 S rRNA, only two variants of geometry are possible as follows: (i) the classic, compact one (so-called “family C”), and (ii) the more branched, loose conformation (“family A”) (56), which should have different mobility in native gel (Fig. 5A).

Because the shift from family C to family A conformation should be accompanied by a substantial change of geometric parameters of the molecule, we decided to measure directly the distance between two most characteristic points of 5 S rRNA, the extremities of its major domains, in both forms. For this, we used the *in gel* FRET technique, which allows coupling of the FRET efficiency measurement to native gel electrophoresis (22). Thus, the identity and the conformation of molecule are better controlled, and the probability of a complex mixture of forms is largely decreased. Human 5 S rRNA molecules were assembled from three oligonucleotides in the way shown on Fig. 5B, either in the presence or in the absence of magnesium. Both mixtures were resolved by native PAGE (Fig. 5C), and FRET efficiencies were determined for each conformation (Fig. 5D and Table 2). Interestingly, although the distance between the fluorophores in the 5 S rRNA<sup>Mg</sup> is in perfect agreement with data obtained earlier in other in-solution studies, that in the 5 S rRNA<sup>EDTA</sup> indicates a crucial rearrangement of the molecule that results in bringing together both extremities. Such a drastic conformational shift can be only explained by a cooperative reorganization of the loops A and B, as reflected in the model shown on Fig. 5E.

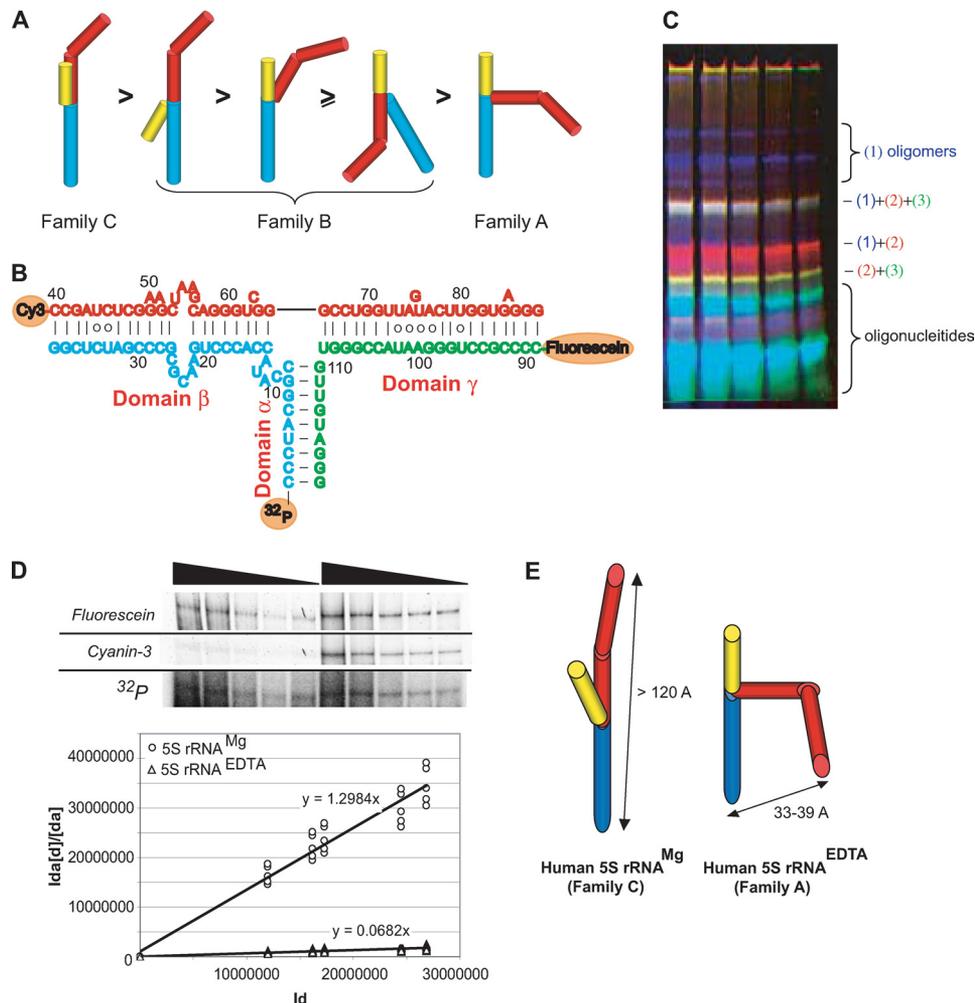
A very important difference between the two human 5 S rRNA forms should be emphasized. Whereas in the classic family C structure the major groove of the  $\alpha$ -domain is inaccessible because of the contact with the  $\beta$ -domain (57), it becomes fully open in the family A form (Fig. 5E). Because it was shown previously that one of the signals of mitochondrial localization of 5 S rRNA resides in the proximal part of the  $\alpha$ -domain (Fig. 1A) (11), and the same site is absolutely necessary for the 5 S rRNA-rhodanese interaction (Fig. 3D), it becomes clear why only the 5 S rRNA<sup>EDTA</sup> (family A), and not the 5 S rRNA<sup>Mg</sup> (family C), is able to bind and to fold the denatured rhodanese (Fig. 4A). This result reveals the biologic significance of both the conformation-specific 5 S rRNA-rhodanese association and the  $\alpha$ -domain-dependent targeting of 5 S rRNA into mitochondria.

## DISCUSSION

RNA import into mitochondria is a quasi-universal phenomenon among eukaryotes. Nevertheless, unlike the mitochondrial pre-protein import pathway, the mechanisms cytosolic RNAs exploit to get into mitochondria seem to have evolved independently in different phyla, explaining the extreme diversity of physico-chemical requirements and protein factors involved (58). The overwhelming majority of data accumulated to date concerns numerous examples of tRNA import, for some of which protein factors implicated in mitochondrial targeting

and translocation of cytosolic RNAs have been identified (10, 59–64). However, in mammalian cells, quite a particular case of 5 S rRNA import into mitochondria was reported (8, 9).

Investigation of this pathway appears to be of fundamental interest because of the following: (i) its mechanism and biologic significance remain unclear and somewhat enigmatic, and (ii) it



**FIGURE 5. Conformation of human 5 S rRNA in solution.** *A*, conformations of 5 S rRNA with various loop A organizations (as proposed by Ref. 56) and the putative order of their relative mobilities in native gel. Domains are colored as follows:  $\alpha$ , yellow;  $\beta$ , red; and  $\gamma$ , blue. *B*, secondary structure of human 5 S rRNA assembled from oligonucleotides labeled with the following: 1)  $^{32}\text{P}$ -phosphate; 2) cyanin-3; and 3) fluorescein. *C*, typical native gel used for separation of annealing products and *in gel* FRET measurements. Superposition of fluorescein (green), cyanin-3 (red), and  $^{32}\text{P}$  (blue) signals. *D*, example of *in gel* FRET measurement for human 5 S rRNA<sup>Mg</sup> (*in gel* fluorescence signals and the autoradiography of the same gel are presented, see “Experimental Procedures” for more details) and linearization of experimental data used for calculation of FRET efficiencies in 5 S rRNA<sup>Mg</sup> and 5 S rRNA<sup>EDTA</sup>. *E*, model of domain level tertiary structures of human 5 S rRNA<sup>Mg</sup> and 5 S rRNA<sup>EDTA</sup> based on *in gel* FRET data (Table 2) and known geometric parameters (57).

**TABLE 2**  
Results of *in gel* FRET analysis of human 5 S rRNA compared with other known 5 S rRNA<sup>Mg</sup> measurements

5 S rRNA	FRET efficiency	Distance between extremities of domains- $\beta$ and - $\gamma$	Ref.
		$\text{\AA}$	
Human 5 S rRNA <sup>Mg</sup>	<0	>120	This study
Human 5 S rRNA <sup>EDTA</sup>	0.93 $\pm$ 0.03	36 $\pm$ 3	This study
<i>E. coli</i> 5 S rRNA in solution		162 (maximum dimension)	67
		160 (maximum dimension)	68
		125 (maximum dimension)	69
		133	67
		155 (extremely expanded)	67
<i>Thermus flavus</i> 5 S rRNA in solution		120 $\pm$ 5	70
<i>Xenopus laevis</i> 5 S rRNA (theoretical model)		118	71
<i>E. coli</i> 5 S rRNA in ribosome (Protein Data Bank code 1C2X)		111	72
<i>Thermus thermophilus</i> 5 S rRNA in ribosome (Protein Data Bank code 1GIY)		84	73
<i>Haloarcula marismortui</i> 5 S rRNA in ribosome (Protein Data Bank code 1JJ2)		84	57
<i>Deinococcus radiodurans</i> 5 S rRNA in ribosome (Protein Data Bank code 1NKW)		73	74

presents a unique opportunity to confront different RNA import mechanisms for a better understanding of laws governing such a kind of transport processes.

Previously, physico-chemical requirements and structural elements functioning as signals of mitochondrial localization of human 5 S rRNA were characterized (10, 11). In this study, we continue the dissection of this pathway by identification of one of protein factors implicated in 5 S rRNA mitochondrial targeting. Mitochondrial thiosulfate sulfurtransferase, rhodanese, traditionally thought to be involved in sulfur metabolism and cyanide detoxication (12), appears to have been recruited for an unrelated “second job,” participating in the pathway of 5 S rRNA import into mammalian mitochondria. Surprising though it may seem, one should not forget that the rhodanese homology domain superfamily embraces proteins of extremely diversified functions, RNA metabolism, and macromolecular transport included (12). Indeed, rhodanese possesses all traits necessary to accomplish such a task as 5 S rRNA mitochondrial targeting as follows: (i) synthesized in cytosol, it is then directed into mitochondrial matrix (24, 25); (ii) it has strong specific affinity to 5 S rRNA; (iii) the binding sites rhodanese exploits for this interaction match the signals of 5 S rRNA mitochondrial localization; and (iv) the clear concentration dependence of 5 S rRNA

## Rhodanese Directs 5 S rRNA Mitochondrial Import

import on rhodanese in both *in vitro* and *in vivo* systems indicates its direct involvement in the pathway.

The detailed study of the 5 S rRNA-rhodanese interaction let us approach the mechanistic aspect of the 5 S rRNA targeting process. We show here that the binding can occur cotranslationally, and 5 S rRNA apparently behaves as a cochaperone for the nascent rhodanese. This finding enables us to draw two interesting parallels. First, the obvious similarity between 5 S rRNA-rhodanese and 5 S rRNA-ribosomal protein L5 interactions (33) suggests that the same and unique principle can be applied to both nucleolar and mitochondrial targeting of 5 S rRNA in mammalian cells; the 5 S rRNA actively changes the conformation of the protein upon cotranslational binding to ensure their concerted relocalization. This principle provides the mechanistic base for the “cross-roads hypothesis” proposed earlier, according to which the intracellular distribution of 5 S rRNA is a matter of direct competition between the L5 protein and mitochondrial import factors for the cargo (11). Second, the functional mimicry of protein cochaperones involved in mitochondrial targeting of pre-proteins that 5 S rRNA demonstrates upon its binding to rhodanese hints at the possibility of exploiting the more ancient protein precursor import pathway for the concomitant 5 S rRNA delivery into mammalian mitochondria. In line with earlier findings that the intact pre-protein translocation apparatus or at least some of its components are involved in RNA mitochondrial import in yeast (61), human (10), and plants (64), this result once again suggests that a close association between the two macromolecular import pathways does exist in these systems.

Recruitment of an apparently unrelated protein for RNA transport into mitochondria is not unprecedented however. Thus, enolase, known in the first place as a glycolytic enzyme, was shown to be an essential component of the tRNA<sup>Lys</sup> import vehicle in yeast (63). Found to possess the specific affinity to the tRNA and located in the vicinity of mitochondria, it can be compared to some extent with the part rhodanese plays in 5 S rRNA import into mammalian mitochondria. Still, a substantial difference is to be outlined; enolase, devoid of any mitochondrial localization signal, is obliged to donate the cargo RNA to another import factor, the precursor of mitochondrial lysyl-tRNA synthetase, whereas rhodanese seems to be well enough equipped to perform the role of carrier for 5 S rRNA on its own.

Intriguingly, by investigating the human 5 S rRNA chaperone activity, we have found that only a particular “more branched” conformation with the family A geometry is capable of productive binding to misfolded rhodanese. This conformation (the only one in which the main rhodanese-binding site is available for interaction) cannot exist in a magnesium-containing medium however. It suggests involvement of some upstream protein factor(s) needed to induce such a kind of structural rearrangement, the classic example of such a protein-dependent three-way junction reorganization was the binding of ribosomal protein S15 to 16 S rRNA (65). The necessity to induce an import-competent RNA conformation was also reported for the yeast tRNA<sup>Lys</sup> mitochondrial targeting system, where the function of RNA chaperone is ensured by enolase (63, 66). Identification of analogous chaperone factors (obvi-

ously, present in the 17Q/80AS fraction) is one of the next major challenges for the further 5 S rRNA import research.

Finally, identification of rhodanese as one of the 5 S rRNA import factors enabled us to approach the functional role of the imported molecule in the mitochondrial compartment of the mammalian cell. A robust correlation between the 5 S rRNA mitochondrial level and the general mitochondrial translational activity was established in experiments *in vivo* (Fig. 2). This intriguing finding, together with the previous report of equimolarity between 5 S rRNA molecules present in human mitochondria and mitochondrial ribosomes (10), suggests that the cytosolic 5 S rRNA can be intimately implicated in mitochondrial protein synthesis. The precise molecular function of 5 S rRNA (*e.g.* being a structural component of mitochondrial ribosome or involvement into its assembly) still awaits further elucidation.

---

*Acknowledgments*—We thank C. Lemaitre-Guillier for mass spectrometry analysis, E. Vinogradova for optimization of siRNA silencing procedure, and A. Keilbach for administrative help.

---

## REFERENCES

1. Koc, E. C., Burkhardt, W., Blackburn, K., Moyer, M. B., Schlatzer, D. M., Moseley, A., and Spremulli, L. L. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 43958–43969
2. Smirnov, A. V., Entelis, N. S., Krasheninnikov, I. A., Martin, R., and Tarassov, I. A. (2008) *Biochemistry* **73**, 1418–1437
3. Smith, M. W., Meskauskas, A., Wang, P., Sergiev, P. V., and Dinman, J. D. (2001) *Mol. Cell. Biol.* **21**, 8264–8275
4. Guddat, U., Bakken, A. H., and Pieler, T. (1990) *Cell* **60**, 619–628
5. Rudt, F., and Pieler, T. (1996) *EMBO J.* **15**, 1383–1391
6. Ogata, K., Kurashashi, A., Nishiyama, C., and Terao, K. (1993) *Eur. J. Biochem.* **213**, 1277–1282
7. Hanas, J. S., Hocker, J. R., Cheng, Y. G., Lerner, M. R., Brackett, D. J., Lightfoot, S. A., Hanas, R. J., Madhusudhan, K. T., and Moreland, R. J. (2002) *Gene* **282**, 43–52
8. Yoshionari, S., Koike, T., Yokogawa, T., Nishikawa, K., Ueda, T., Miura, K., and Watanabe, K. (1994) *FEBS Lett.* **338**, 137–142
9. Magalhães, P. J., Andreu, A. L., and Schon, E. A. (1998) *Mol. Biol. Cell* **9**, 2375–2382
10. Entelis, N. S., Kolesnikova, O. A., Dogan, S., Martin, R. P., and Tarassov, I. A. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 45642–45653
11. Smirnov, A., Tarassov, I., Mager-Heckel, A. M., Letzelter, M., Martin, R. P., Krasheninnikov, I. A., and Entelis, N. (2008) *RNA* **14**, 749–759
12. Cipollone, R., Ascenzi, P., and Visca, P. (2007) *ILBMB Life* **59**, 51–59
13. Dulbecco, R., and Freeman, G. (1959) *Virology* **8**, 396–397
14. Gaines, G., and Attardi, G. (1984) *Mol. Cell. Biol.* **4**, 1605–1617
15. Kolesnikova, O. A., Entelis, N. S., Jacquin-Becker, C., Goltzene, F., Chrzanoska-Lightowers, Z. M., Lightowers, R. N., Martin, R. P., and Tarassov, I. (2004) *Hum. Mol. Genet.* **13**, 2519–2534
16. Silberg, J. J., Hoff, K. G., and Vickery, L. E. (1998) *J. Bacteriol.* **180**, 6617–6624
17. Panda, M., Gorovits, B. M., and Horowitz, P. M. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 63–70
18. Fernandez-Silva, P., Martinez-Azorin, F., Micol, V., and Attardi, G. (1997) *EMBO J.* **16**, 1066–1079
19. Henis, Y. I., and Levitzki, A. (1976) *Eur. J. Biochem.* **71**, 529–532
20. Mendoza, J. A., Rogers, E., Lorimer, G. H., and Horowitz, P. M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13587–13591
21. Lin, E., Lin, S. W., and Lin, A. (2001) *Nucleic Acids Res.* **29**, 2510–2516
22. Radman-Livaja, M., Biswas, T., Mierke, D., and Landy, A. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 3913–3920
23. Norman, D. G., Grainger, R. J., Uhrin, D., and Lilley, D. M. (2000) *Biochemistry* **39**, 6317–6324

24. Miller, D. M., Delgado, R., Chirgwin, J. M., Hardies, S. C., and Horowitz, P. M. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 4686–4691
25. Waltner, M., Hammen, P. K., and Weiner, H. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 21226–21230
26. Giaever, G., Chu, A. M., Ni, L., Connelly, C., Riles, L., Véronneau, S., Dow, S., Lucau-Danila, A., Anderson, K., André, B., Arkin, A. P., Astromoff, A., El-Bakkoury, M., Bangham, R., Benito, R., Brachat, S., Campanaro, S., Curtiss, M., Davis, K., Deutschbauer, A., Entian, K. D., Flaherty, P., Foury, F., Garfinkel, D. J., Gerstein, M., Gotte, D., Güldener, U., Hegemann, J. H., Hempel, S., Herman, Z., Jaramillo, D. F., Kelly, D. E., Kelly, S. L., Kötter, P., LaBonte, D., Lamb, D. C., Lan, N., Liang, H., Liao, H., Liu, L., Luo, C., Lussier, M., Mao, R., Menard, P., Ooi, S. L., Revuelta, J. L., Roberts, C. J., Rose, M., Ross-Macdonald, P., Scherens, B., Schimmack, G., Shafer, B., Shoemaker, D. D., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R. K., Strathern, J. N., Valle, G., Voet, M., Volckaert, G., Wang, C. Y., Ward, T. R., Wilhelm, J., Winzler, E. A., Yang, Y., Yen, G., Youngman, E., Yu, K., Bussey, H., Boeke, J. D., Snyder, M., Philippsen, P., Davis, R. W., and Johnston, M. (2002) *Nature* **418**, 387–391
27. De Duve, C., Pressman, B. C., Gianetto, R., Wattiaux, R., and Appelmans, F. (1955) *Biochem. J.* **60**, 604–617
28. Eilers, M., and Schatz, G. (1986) *Nature* **322**, 228–232
29. Glick, B., and Schatz, G. (1991) *Annu. Rev. Genet.* **25**, 21–44
30. Ryan, M. T., Naylor, D. J., Høj, P. B., Clark, M. S., and Hoogenraad, N. J. (1997) *Int. Rev. Cytol.* **174**, 127–193
31. Hardesty, B., Kudlicki, W., Odom, O. W., Zhang, T., McCarthy, D., and Kramer, G. (1995) *Biochem. Cell Biol.* **73**, 1199–1207
32. Kudlicki, W., Odom, O. W., Kramer, G., Hardesty, B., Merrill, G. A., and Horowitz, P. M. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 10650–10657
33. DiNitto, J. P., and Huber, P. W. (2003) *J. Mol. Biol.* **330**, 979–992
34. Kim, H. K., Choi, S. I., and Seong, B. L. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 1177–1181
35. Herschlag, D. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 20871–20874
36. Kudlicki, W., Coffman, A., Kramer, G., and Hardesty, B. (1997) *Fold. Des.* **2**, 101–108
37. Semrad, K., Green, R., and Schroeder, R. (2004) *RNA* **10**, 1855–1860
38. Tompa, P., and Csermely, P. (2004) *FASEB J.* **18**, 1169–1175
39. Weber, F., and Hayer-Hartl, M. (2000) *Methods Mol. Biol.* **140**, 111–115
40. Kurganov, B. I. (2002) *Biochemistry* **67**, 409–422
41. Minami, Y., Höhfeld, J., Ohtsuka, K., and Hartl, F. U. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 19617–19624
42. Minami, Y., and Minami, M. (1999) *Genes Cells* **4**, 721–729
43. Goswami, A. V., Chittoor, B., and D'Silva, P. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 19472–19482
44. Lu, Z., and Cyr, D. M. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 27824–27830
45. Nishikori, S., Yamanaka, K., Sakurai, T., Esaki, M., and Ogura, T. (2008) *Genes Cells* **13**, 827–838
46. Hendrick, J. P., Langer, T., Davis, T. A., Hartl, F. U., and Wiedmann, M. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **90**, 10216–10220
47. Kudlicki, W., Odom, O. W., Kramer, G., and Hardesty, B. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 31160–31165
48. Thoms, S. (2002) *FEBS Lett.* **520**, 107–110
49. Gliubich, F., Gazerro, M., Zanotti, G., Delbono, S., Bombieri, G., and Berni, R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 21054–21061
50. Okada, S., Okada, T., Aimi, T., Morinaga, T., and Itoh, T. (2000) *FEBS Lett.* **485**, 153–156
51. Artigues, A., Iriarte, A., and Martínez-Carrion, M. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 25047–25055
52. Bhangoo, M. K., Tzankov, S., Fan, A. C., Dejgaard, K., Thomas, D. Y., and Young, J. C. (2007) *Mol. Biol. Cell* **18**, 3414–3428
53. Egebjerg, J., Christiansen, J., Brown, R. S., Larsen, N., and Garrett, R. A. (1989) *J. Mol. Biol.* **206**, 651–668
54. Kuliński, T., Bratek-Wiewiórowska, M. D., Wiewiórowski, M., Zielenkiewicz, A., Zólkiewski, M., and Zielenkiewicz, W. (1991) *Nucleic Acids Res.* **19**, 2449–2455
55. Toots, I., Misselwitz, R., Böhm, S., Welfe, H., Vilems, R., and Saarma, M. (1982) *Nucleic Acids Res.* **10**, 3381–3389
56. Lescoute, A., and Westhof, E. (2006) *RNA* **12**, 83–93
57. Ban, N., Nissen, P., Hansen, J., Moore, P. B., and Steitz, T. A. (2000) *Science* **289**, 905–920
58. Tarassov, I., Kamenski, P., Kolesnikova, O., Karicheva, O., Martin, R. P., Krashennikov, I. A., and Entelis, N. (2007) *Cell Cycle* **6**, 2473–2477
59. Bouzaidi-Tiali, N., Aeby, E., Charrière, F., Pusnik, M., and Schneider, A. (2007) *EMBO J.* **26**, 4302–4312
60. Tarassov, I., Entelis, N., and Martin, R. P. (1995) *EMBO J.* **14**, 3461–3471
61. Tarassov, I., Entelis, N., and Martin, R. P. (1995) *J. Mol. Biol.* **245**, 315–323
62. Brandina, I., Graham, J., Lemaitre-Guillier, C., Entelis, N., Krashennikov, I., Sweetlove, L., Tarassov, I., and Martin, R. P. (2006) *Biochim. Biophys. Acta* **1757**, 1217–1228
63. Entelis, N., Brandina, I., Kamenski, P., Krashennikov, I. A., Martin, R. P., and Tarassov, I. (2006) *Genes Dev.* **20**, 1609–1620
64. Salinas, T., Duchêne, A. M., Delage, L., Nilsson, S., Glaser, E., Zaepfel, M., and Maréchal-Drouard, L. (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 18362–18367
65. Batey, R. T., and Williamson, J. R. (1998) *RNA* **4**, 984–997
66. Kolesnikova, O., Kazakova, H., Comte, C., Steinberg, S., Kamenski, P., Martin, R. P., Tarassov, I., and Entelis, N. (2010) *RNA* **16**, 926–941
67. Skibinska, L., Banachowicz, E., Gapiński, J., Patkowski, A., and Barciszewski, J. (2004) *Biopolymers* **73**, 316–325
68. Fox, J. W., and Wong, K. P. (1979) *J. Biol. Chem.* **254**, 10139–10144
69. Osterberg, R., Sjöberg, B., and Garrett, R. A. (1976) *Eur. J. Biochem.* **68**, 481–487
70. Funari, S. S., Rapp, G., Perbandt, M., Dierks, K., Vallazza, M., Betzel, C., Erdmann, V. A., and Svergun, D. I. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 31283–31288
71. Westhof, E., Romby, P., Romaniuk, P. J., Ebel, J. P., Ehresmann, C., and Ehresmann, B. (1989) *J. Mol. Biol.* **207**, 417–431
72. Mueller, F., Sommer, I., Baranov, P., Matadeen, R., Stoldt, M., Wöhner, J., Görlach, M., van Heel, M., and Brimacombe, R. (2000) *J. Mol. Biol.* **298**, 35–59
73. Yusupov, M. M., Yusupova, G. Z., Baucom, A., Lieberman, K., Earnest, T. N., Cate, J. H., and Noller, H. F. (2001) *Science* **292**, 883–896
74. Harms, J., Schlutzenzen, F., Zarivach, R., Bashan, A., Gat, S., Agmon, I., Bartels, H., Franceschi, F., and Yonath, A. (2001) *Cell* **107**, 679–688

# **CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES**



L'ensemble des résultats obtenus au cours de cette thèse ont permis de montrer que l'adressage dans les mitochondries humaines d'oligonucléotides complémentaires aux molécules d'ADNmt muté permettait d'aboutir à une baisse du taux d'hétéroplasmie. Cette stratégie, dite anti-génomique, avait jusqu'alors été démontrée exclusivement *in vitro*, et c'est la première fois que la faisabilité de cette approche est démontrée dans un système de cellules humaines en culture.

## **I Analyse de l'import de l'ARN F1D1 et des ARN recombinants dans les mitochondries humaines**

La principale difficulté à surmonter pour passer d'un système *in vitro* à *in vivo* consistait à arriver à importer des oligonucléotides ayant un potentiel anti-répliatif dans les mitochondries des cellules. Nous avons réussi à franchir cette difficulté en exploitant les connaissances accumulées au laboratoire ces dernières années sur la voie d'import de l'ARNt<sup>Lys</sup> CUU (TRK1) dans les mitochondries de la levure *S. cerevisiae*. L'ARN ayant servi de vecteur à l'importation de ces oligonucléotides dans les mitochondries humaines est l'ARN F1D1. Cet ARN a été construit à la suite d'expériences de SELEX élaborées pour comprendre la spécificité d'importation de l'ARNt<sup>Lys</sup> CUU (TRK1) de levure par rapport à l'ARNt<sup>Lys</sup> UUU (TRK2) qui ne l'est pas. Les ARN sélectionnés par le biais de cette approche se sont révélés posséder une structure secondaire différente de celle des ARNt de départ. L'analyse de ce changement de conformation par FRET a permis de démontrer que l'import reposait en partie sur un réarrangement structural de TRK1. Ce réarrangement se fait par l'intermédiaire d'une hélice alternative F formée de la partie 3' de l'ARNt et d'une partie de la boucle T. La formation de cette hélice induit une structure secondaire alternative de l'ARNt avec la destruction du bras de l'anticodon mais pas de celle du bras D de l'ARNt. La fusion du bras D à l'hélice alternative F a permis d'obtenir un petit ARN artificiel F1D1 importé *in vitro* non seulement dans les mitochondries de levure mais également humaines avec une efficacité d'import supérieure à celle de TRK1, nous permettant d'envisager son utilisation à des fins thérapeutiques.

## 1 Etude des facteurs d'import de TRK1 et F1D1

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de caractériser partiellement l'import dans les mitochondries humaines de TRK1, de F1D1 et d'ARN recombinants au potentiel anti-répliatif. Leur import suggère que la cellule humaine possède tous les facteurs protéiques nécessaires à l'import, et que ces facteurs sont similaires à ceux permettant l'import spécifique de TRK1 chez la levure. L'import de TRK1 chez la levure nécessite deux facteurs cytosoliques solubles, l'énolase, une enzyme de la glycolyse, et la pré-lysyl-ARNt synthétase. L'énolase jouerait un rôle de chaperonne en reconnaissant TRK1 sur la base de sa possibilité de former l'hélice F et en stabilisant cette structure. Cela permettrait à l'énolase d'adresser l'ARNt vers la membrane mitochondriale externe et d'être pris en charge par la pré-lysyl-ARNt synthétase qui permettrait quant à elle l'acheminement de l'ARNt vers la matrice de la mitochondrie.

L'implication de l'énolase et de la pré-lysyl-ARNt-synthétase dans l'import des ARN F1D1 et TRK1 a été investiguée en incubant ces ARN avec des mitochondries humaines isolées en présence de fractions protéiques humaines partiellement purifiées. Les résultats ont démontré que l'import nécessitait bien des facteurs protéiques et qu'ils étaient au moins au nombre de deux. L'identification des protéines contenues dans une de ces fractions a permis de suggérer l'implication de l'énolase, cette protéine étant capable de remplacer la fraction protéique la contenant pour diriger l'import de TRK1 et de F1D1. Il est intéressant de noter que l'énolase semble nécessaire à l'import malgré que l'hélice F soit déjà formée dans la structure de F1D1. Ces résultats semblent donc confirmer que la protéine est importante pour l'acheminement de l'ARNt vers la mitochondrie et pour la transmission de l'ARN à la synthétase. On peut de plus supposer que la raison pour laquelle l'ARN F1D1 est importé de façon plus efficace que TRK1 dans les mitochondries *in vivo* repose sur le fait que son hélice F est déjà formée, directement reconnaissable par l'énolase alors que TRK1 pourrait être également reconnu par les protéines de la traduction cytosolique.

Le rôle de l'énolase et de la pré-lysyl-ARNt-synthétase dans l'import de F1D1 et de TRK1 dans les mitochondries humaines sera toutefois à vérifier par des analyses complémentaires. La reconstitution d'un système d'import minimal contenant des mitochondries humaines isolées, l'énolase, la pré-lysyl-ARNt synthétase et les ARN TRK1 et F1D1 sera à réaliser. Si la présence de ces deux seules protéines permettait l'import des ARN comme supposé, il sera également intéressant de visualiser leur capacité à former un complexe avec l'énolase et la pré-lysyl-ARNt synthétase humaine, par exemple par retard sur

gel. Ces deux approches nécessitant des protéines pures, la production de la synthétase, non disponible, est actuellement en cours à partir d'un plasmide recombinant. On peut également imaginer la mise en place d'expériences consistant soit à inhiber, soit à surexprimer l'énolase et la pré-lysyl-ARNt-synthétase dans des cellules humaines en culture pour en analyser l'impact sur l'efficacité d'import des ARN.

## 2 Etude de l'ARN F1D1 comme vecteur d'importation

L'étude de l'import des ARN recombinants dans les mitochondries des cellules cybrides a également permis de dégager certaines caractéristiques de leur mécanisme d'adressage. Tout d'abord, l'ajout d'insert en différentes positions de la structure de l'ARN F1D1 n'a pas conduit à l'inhibition de son import. Ces résultats ont permis de montrer qu'il était possible d'utiliser l'ARN F1D1 comme vecteur d'importation. Les ARN recombinants ont été modélisés à l'aide du logiciel Mfold de telle façon à ce que la structure des hélices D et F soit conservée et qu'une seule structure secondaire de l'ARN recombinant soit prédite. Toutefois, il est fort probable qu'un mélange de structures alternatives des ARN existe dans la cellule, ne serait-ce de par le fait que les structures prédites par Mfold le sont à des concentrations en cations qui ne sont pas physiologiques. Il est *a priori* difficile de déterminer la ou les structures adoptées par les ARN dans la cellule, mais également dans la mitochondrie où la concentration en sels peut être différente de celle du cytoplasme. L'import des ARN recombinants dans les mitochondries laisse toutefois supposer qu'au moins une partie du pool d'ARN cytosolique contient bien les hélices F et D intègres, reconnaissables par les facteurs d'import ou par des récepteurs protéiques à la surface de la membrane mitochondriale externe. En effet, la construction d'un ARN de taille équivalente à l'ARN FD-L mais de séquence et de structure différente s'est révélée ne pas être importable, semblant démontrer que l'import des ARN recombinants repose bien sur la présence des hélices D et F. Il est possible que les différences d'efficacité d'import relatives calculées pour tous les ARN recombinants testés soient dues à la présence d'un mélange de structures alternatives plus ou moins importantes pour chaque ARN, aboutissant à la réduction du nombre d'ARN importables contenant les hélices D et F accessibles. Si ces efficacités d'import sont différentes, variant d'un facteur 1 à 3, les seules qui se démarquent réellement sont celles des ARN chimériques D22-ADN et D22-ADNT contenant un insert en ADN possédant une efficacité d'import environ 6 fois supérieure à celle de D22. On peut imaginer que l'insert en ADN soit moins enclin à perturber la structure de l'hélice D, augmentant de ce fait le nombre

de molécules de l'ARN chimérique D22-ADN importables par rapport aux autres ARN recombinants.

Les résultats énoncés ici ne constituent qu'un ensemble de preuves indirectes de la maintenance de la structure des hélices F et D. Des expériences seront à réalisées pour tenter de visualiser la structure réelle des ARN. On peut imaginer de poursuivre les expériences de FRET ayant permis de démontrer la formation de l'hélice F dans la structure de TRK1, mais également la mise en place d'expériences de foot-print consistant à étudier les ARN recombinants en complexe avec les facteurs d'import et de les soumettre à des RNases pour visualiser quelle partie de l'ARN aura été protégée.

### 3 Etude des déterminants d'importation

L'ARN F1D1 avait été construit en fusionnant les hélices F et D sur la base des tests d'import dans des mitochondries isolées de levure, montrant que les hélices F et D pouvaient être importées par elles-mêmes mais que l'import était augmenté d'un facteur 10 lorsqu'elles étaient conjuguées. Les résultats obtenus pendant cette thèse ont montré que les deux hélices prises séparément et fusionnées à un insert étaient également importées *in vivo* dans les mitochondries humaines. Toutefois, au contraire des résultats qui avaient été obtenus *in vitro*, il semblerait que les deux hélices prises séparément soient importées *in vivo* avec la même efficacité que F1D1 dans les mitochondries humaines. En effet, bien que l'import des ARN D22 et 21F n'ait pas été comparé directement avec celui de F1D1, leurs efficacités d'import se sont révélées supérieures à celle de l'ARN FD-L lui-même importé avec une efficacité supérieure à F1D1. Il semblerait donc que la fusion des deux hélices n'apporte finalement pas de réel avantage à l'import et que les hélices prises séparément constituent à elles seules un vecteur d'import des oligonucléotides au potentiel anti-répliatif. Il est toutefois possible que l'insert puisse adopter une structure de type tige-boucle non prédite par Mfold mais influençant l'import. Une telle structure a par exemple été prédite dans l'ARN de la RNase P et s'est révélée non seulement nécessaire à son import dans les mitochondries humaines mais capable d'importer des ARN qui ne le sont pas normalement (Wang et al, 2010). Il faudra donc tester si chacune de ces hélices D et F non couplées à un insert reste importables séparément. Il sera de plus intéressant d'analyser par des tests d'import *in vitro* et des expériences de retard sur gel si ces deux hélices interagissent avec l'énolase et la pré-lysyl-ARNt-synthetase.

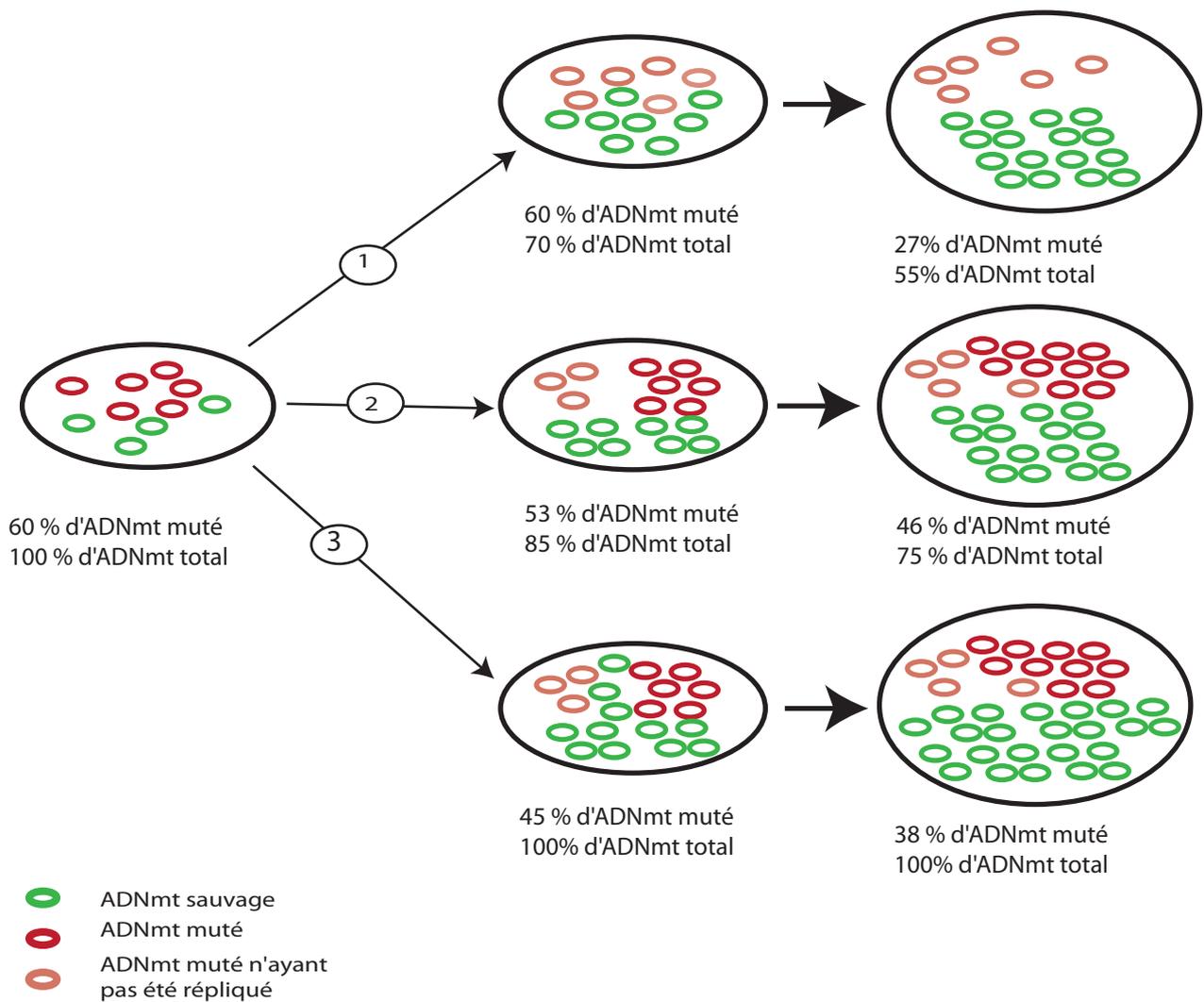
En conclusion, bien que le mécanisme d'import des ARN TRK1, F1D1 et des ARN recombinants reste à déterminer, la construction de ces derniers a permis d'importer dans les mitochondries des oligonucléotides complémentaires à l'ADNmt muté et ainsi de pouvoir analyser pour la première fois leur effet sur le taux d'hétéroplasmie dans les cellules humaines.



## II Analyse de l'effet des ARN recombinants sur le taux d'hétéroplasmie

Une fois présents dans la matrice mitochondriale, les obstacles à franchir par les ARN recombinants pour aboutir à une baisse du taux d'hétéroplasmie sont nombreux. Ils doivent cibler l'ADNmt protégé au sein du nucléoïde par de nombreuses protéines, s'hybrider spécifiquement à l'ADNmt muté, et former un duplex suffisamment stable pour bloquer la polymérase et empêcher l'avancement de la fourche de réplication. Cependant, les résultats obtenus au cours de ce travail de thèse semblent indiquer que toutes ces difficultés pourraient avoir été franchies. La transfection des cellules par les ARN comportant les inserts au potentiel anti-répliatif a en effet abouti à l'obtention d'une diminution spécifique du taux d'ADNmt délété. Le shift d'hétéroplasmie est de 20% lorsque les cellules sont transfectées avec soit un ARN s'hybridant au brin H soit un ARN s'hybridant au brin L de l'ADNmt muté. Ce shift est observé 5 à 6 jours après la transfection. Lorsque les cellules sont transfectées avec les deux types d'ARN s'hybridant à la fois au brin H et L, le shift d'hétéroplasmie atteint 35% dès le quatrième jour suivant la transfection. Dans chaque cas, le taux d'hétéroplasmie remonte ensuite à son niveau initial aux alentours du 8<sup>e</sup> jour. Cette remontée semble corrélée au moment où la concentration en ARN recombinants dans la cellule devient quasi nulle. Ainsi, la stabilisation de la concentration en ARN dans les cellules par le biais de transfusions transitoires consécutives a permis de maintenir le taux d'hétéroplasmie en dessous de 65% pendant au moins quatre jours.

Ces résultats, tout en démontrant pour la première fois qu'il est possible d'obtenir un shift d'hétéroplasmie dans des cellules en culture en important dans les mitochondries des oligonucléotides complémentaires à l'ADNmt muté, soulèvent également plusieurs questions. Il reste ainsi à caractériser la nature du mécanisme moléculaire qui préside à la baisse d'hétéroplasmie, à comprendre pourquoi le délai entre le moment de la transfection et l'observation du shift d'hétéroplasmie est aussi long, ou encore pourquoi le taux d'hétéroplasmie remonte à son niveau initial. Les réponses à ces questions sont rendues difficiles par le nombre de paramètres à prendre en compte sans qu'ils ne soient à ce jour eux-mêmes totalement compris : le mode exact de réplication de l'ADNmt, son mode de ségrégation au sein du nucléoïde, de la mitochondrie et de la cellule ou encore son turnover.



**Figure 46: Modélisation de l'effet du ciblage des 2 brins des molécules d'ADNmt mutées par les ARN FD-L et FD-H.**

Le mode de ségrégation des molécules d'ADNmt au sein du nucléoïde, des mitochondries et des cellules n'est pas pris en compte. Les molécules d'ADNmt sont comptabilisées dans un extrait cellulaire total.

1) Inhibition de la réplication de la totalité des molécules mutées sur 2 cycles de réplication

La réplication de l'ADNmt sauvage ne compense pas celle de l'ADNmt inhibée..

2) Inhibition de la réplication de 50% des molécules mutées sur 2 cycles de réplication.

La réplication de l'ADNmt sauvage ne compense pas celle de l'ADNmt muté inhibée.

3) Inhibition de la réplication de 50% des molécules mutées sur 2 cycles de réplication.

La réplication de l'ADNmt sauvage compense celle de l'ADNmt muté inhibée.

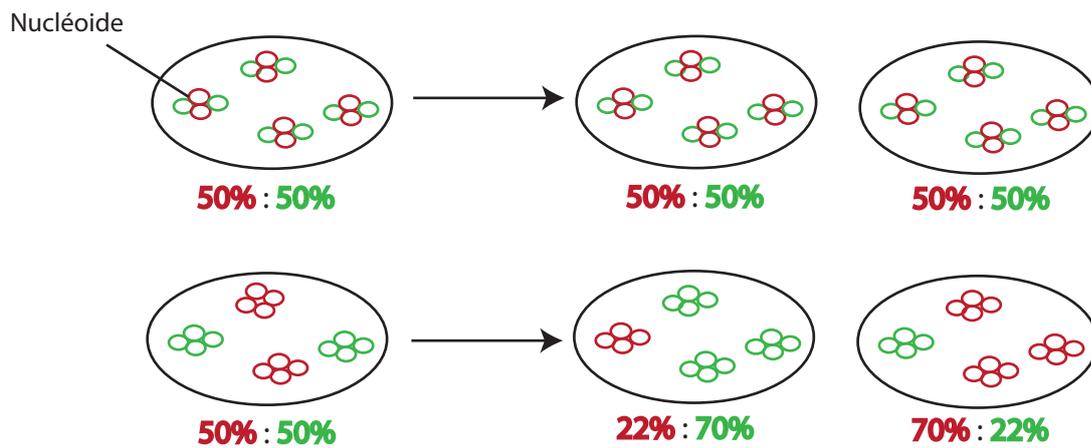
# 1 Compréhension du mécanisme qui préside à la baisse d'hétéroplasmie

La baisse du taux d'hétéroplasmie observée est supposée être engendrée par l'arrêt de la polymérase par l'hybride formé entre l'ARN recombinant et l'ADNmt muté. L'absence de baisse observée lorsque les cellules sont transfectées par des ARN sans insert ou contenant un insert non complémentaire à l'ADNmt semble appuyer cette hypothèse. Toutefois, ces résultats ne permettent pas de conclure de façon catégorique à une inhibition de la réplication de l'ADNmt muté.

Des expériences seront à réaliser afin de compléter ces résultats. Il sera ainsi intéressant de voir si des intermédiaires de la réplication aux extrémités correspondant aux bornes de la délétion sont formés. Il faudra de plus vérifier si l'augmentation du taux d'ADNmt sauvage est corrélée à une augmentation du taux d'ARNt et de protéines dont les gènes sont compris dans la délétion par la technique du northern blot et par des tests de traduction. De même, on pourrait envisager de construire des ARN recombinants contenant un insert s'hybridant à une région à l'intérieur de la délétion, donc uniquement à l'ADNmt sauvage, afin d'observer si cela induit une augmentation du taux de molécules mutées.

La transfection des cellules par les ARN recombinants a abouti à une baisse d'hétéroplasmie, autrement dit à une baisse du taux d'ADNmt muté par rapport au taux d'ADNmt sauvage. Il est probable que cette baisse soit due à une réplication ralentie de l'ADNmt muté ciblé par les ARN recombinants, jusqu'à ce que l'hybride ADN/ARN soit déplacé par la polymérase ou dégradé par des RNases comme la RNase H1. Une modélisation de l'effet des ARN recombinants sur le taux d'hétéroplasmie et le taux d'ADNmt total est représentée en **figure 46**. Parallèlement à la réplication ralentie de l'ADNmt muté, l'ADNmt sauvage pourrait être répliqué à un rythme normal, ce qui induirait une baisse générale de l'ADNmt total (**Fig 46 n°1 et 2**). Par contre si le rythme de la réplication de l'ADNmt sauvage est augmenté pour compenser celui de l'ADNmt muté ralenti, le taux d'ADNmt total devrait rester stable (**Fig 46 n°3**). Ceci pourrait être vérifié par des expériences de qPCR quantifiant le taux d'ADNmt total dans les cellules par rapport au taux d'ADN nucléaire.

Il est à noter que ce modèle ne prend pas en compte deux paramètres. Le premier paramètre qui n'a pas été pris en compte est le phénomène d'avantage répliatif qui veut que les génomes délétés se répliquent plus vite que les génomes sauvages du fait de leur taille plus petite. Cet avantage répliatif est généralement observé suite à une déplétion de l'ADNmt



**Figure 47: Représentation schématique de la ségrégation de l'ADNmt au cours d'une division cellulaire. Adapté de (Gilkerson et al, 2008)**

Les molécules d'ADNmt mutées sont en rouge, les sauvages en vert. Le pourcentage d'ADNmt muté dans chaque cellule est en rouge, le pourcentage d'ADNmt sauvage en vert.

A) Situation dans laquelle les nucléotides sont hétéroplasmiques

B) Situation dans laquelle les nucléotides sont homoplasmiques

total induit par exemple par des traitements au BET inhibant la réplication mitochondriale en général (Diaz et al, 2002).

Le second paramètre à n'avoir pas été pris en compte est celui de la ségrégation de l'ADNmt. En effet, le taux d'hétéroplasmie global des cellules est de 65%, mais il est difficile de savoir si ce taux est identique dans chacune d'elle et dans toutes les mitochondries. La réponse à cette question se situe certainement au niveau du nucléoïde, qui représente l'unité de ségrégation de l'ADNmt. Deux modèles de ségrégation existent. L'un décrit les nucléoïdes homoplasmiques composés à 100% d'ADNmt sauvage ou muté. Ce modèle permet d'expliquer le shift d'hétéroplasmie observé dans certain tissus avec l'âge car il permet une distribution aléatoire des nucléoïdes dans les mitochondries se divisant et fusionnant, conduisant à des cellules aux taux d'hétéroplasmie différents (**Figure 47B**). Le deuxième modèle décrit quant à lui des nucléoïdes à la composition identique, ce qui aboutirait à un niveau d'hétéroplasmie identique dans chaque cellule et permettrait d'expliquer la stabilité de l'hétéroplasmie dans le temps (**Figure 47A**) (Gilkerson & Schon, 2008). Une étude récente dénombrant le nombre de molécules d'ADNmt mutées et sauvages au sein du nucléoïde semble démontrer que les nucléoïdes sont homoplasmiques, favorisant le premier modèle (Poe et al, 2010). Il est donc difficile d'expliquer la stabilité du taux d'hétéroplasmie à 65% que nous observons dans nos cellules cybrides. On peut imaginer que les nucléoïdes ne soient pas distribués au hasard dans les cellules filles, ou que les cellules ou les mitochondries portant un niveau d'hétéroplasmie trop élevé soient éliminées au cours des divisions cellulaires.

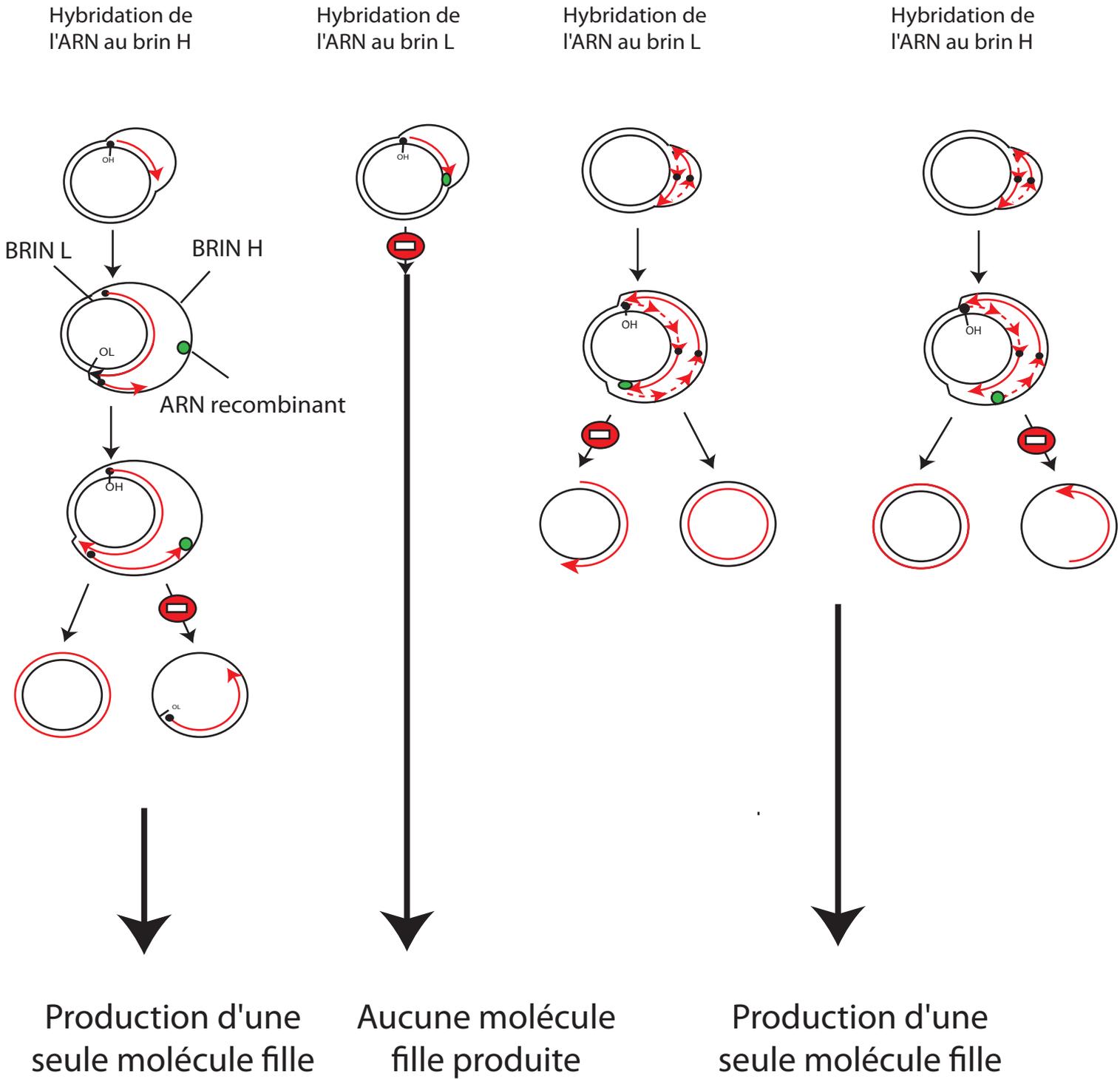
## 2 Stabilisation du taux d'hétéroplasmie

La baisse d'hétéroplasmie observée n'est que transitoire, et la remontée du taux d'ADNmt muté semble corrélée à la disparition des ARN recombinants des cellules. Ceci pourrait être partiellement expliqué par le phénomène de l'avantage répliatif. Dès que les ARN recombinants semblent commencer à être dégradés et dilués par les divisions cellulaires successives, les molécules d'ADNmt délétées commenceraient à se répliquer à nouveau et plus rapidement que l'ADNmt sauvage.

Le shift d'hétéroplasmie ne suffit donc pas à maintenir le taux d'ADNmt muté en dessous de 65%. Afin de pouvoir envisager l'utilisation des ARN recombinants à des fins thérapeutiques, il sera toutefois primordial de pouvoir stabiliser la baisse d'hétéroplasmie sur le long terme en exerçant une pression sélective constante sur la réplication des génomes

Modèle non synchronisé

Modèle synchronisé



**Figure 48: Modélisation de l'effet des ARN recombinants sur la réplication de l'ADNmt.**

Les brins d'ADN néosynthétisés sont en rouge, les fragments d'Okasaki du mode de réplication synchronisé sont en pointillés L'ARN recombinant est représenté par un cercle vert.

délétés. Les expériences réalisées à cette fin au cours de cette thèse ne se sont pas révélées concluantes. Les transfections stables n'ont pas permis d'obtenir l'expression des ARN recombinants dans les cellules et les modifications chimiques au niveau de l'insert ont inhibé l'effet observé sur l'hétéroplasmie. On peut imaginer d'utiliser un autre type de vecteur pour exprimer les ARN de façon stable dans les cellules et de modéliser de nouveaux ARN avec un autre type de modifications chimiques ou en contenant moins. Les molécules chimériques comportant l'hélice D en ARN et l'insert en ADN se sont révélées les plus prometteuses. Il pourrait être intéressant de synthétiser un insert en ADN plus long, ou un ARN chimérique comportant un insert ADN s'hybridant également au bin L de l'ADNmt muté pour pouvoir transfecter les cellules avec les deux types d'ARN chimériques.

Seules les transfections transitoires consécutives avec les ARN s'hybridant à la fois au brin H et au brin L ont semblé prolonger la baisse du taux d'ADNmt muté sur quatre jours. Les transfections transitoires avec un seul ARN n'ont quant à elles pas permis cette stabilisation. On peut imaginer que cela soit dû à un changement du mode de réplication suite à une déplétion du taux d'ADNmt comme cela a déjà été décrit dans la littérature (Pohjoismaki et al, 2010).

### 3 Compréhension du mécanisme de la réplication

Sur un plan fondamental, les résultats obtenus pourraient donc également permettre de mieux comprendre les mécanismes de la réplication. Deux mécanismes sont décrits dans la littérature, l'un reposant sur une réplication synchronisée des brins H et L de l'ADNmt, et l'autre reposant sur une réplication non synchronisée des deux brins (Holt, 2009) (Paragraphe I.3.5.2 de l'introduction, **Figure 6 et 8**). La stratégie anti-génomique avait été originellement imaginée pour cibler le brin H restant simple brin pendant deux tiers de la réplication dans le modèle non synchronisé (Taylor et al, 1997).

Nos résultats semblent toutefois défavoriser le mode de réplication non synchronisé. En effet, le ciblage du brin L par l'ARN FD-H devrait automatiquement inhiber la réplication du brin H puisque l'origine de réplication du brin L n'est pas atteinte (**Figure 48**). Aucune molécule fille ne devrait donc être produite. Par contre, le ciblage du brin H par l'ARN FD-L ne devrait pas inhiber la réplication du brin L et une molécule fille devrait être produite. L'effet de la transfection des cellules par l'ARN FD-H ou FD-L sur le taux d'hétéroplasmie devrait donc être différent, à savoir plus prononcé avec l'ARN FD-H. Ce n'est cependant pas ce que nous observons puisqu'une baisse d'hétéroplasmie similaire est obtenue que les

cellules soient transfectées avec l'ARN FD-H ou avec l'ARN FD-L. Les deux types d'ARN étant capables de produire une baisse d'hétéroplasmie, il semblerait donc qu'ils soient assez petits pour pouvoir s'insérer au niveau de la fourche de réplication en cours de progression. Dans le modèle de réplication synchronisée, la réplication débute de façon bidirectionnelle dans une région appelée ori Z avec synthèse continue sur un brin et la production de fragments d'Okazaki sur l'autre brin. Les deux fourches de réplication s'arrêtent au niveau de l'origine de réplication OH. Le ciblage du brin L ou du brin H devrait donc avoir un effet similaire sur la réplication en inhibant la production d'une molécule fille. Lorsqu'un mélange des deux types d'ARN est utilisé, une baisse d'hétéroplasmie plus prononcée est observée et ce dès le quatrième jour suivant la transfection. Ces résultats suggèrent par conséquent que le ciblage des deux brins pourrait empêcher la production des deux molécules filles de l'ADNmt, alors que le ciblage d'un seul brin pourrait éventuellement conduire à la formation d'une des deux molécules d'ADN filles. Cette hypothèse nous permet donc de favoriser la réplication synchronisée des deux brins de l'ADNmt qui permettrait d'expliquer pourquoi l'ARN FD-H et FD-L aboutissent à un même effet sur l'hétéroplasmie et pourquoi la transfection simultanée des deux ARN provoque une baisse d'hétéroplasmie plus prononcée que lorsque les cellules sont transfectées avec un seul ARN.

Il a été proposé que le mode de réplication non synchronisé pouvait prévaloir dans les cellules en situation normale tandis que le mode de réplication synchronisé pourrait avoir lieu dans les cellules requérant une synthèse d'ADNmt rapide, par exemple en réponse à une baisse de l'ADNmt (Pohjoismaki et al, 2010). Nos résultats pourraient néanmoins être expliqués par le modèle inverse : un mode de réplication synchronisé suivi d'un mode non synchronisé successif à une déplétion de l'ADNmt total. Cette hypothèse repose sur le fait que les transfections successives avec l'ARN FD-L n'aient pas abouti à une stabilisation de la baisse d'hétéroplasmie, contrairement à la retransfection simultanée des ARN FD-L et FD-H. Si le mode de réplication synchronisé était le modèle prévalant avant la deuxième transfection comme décrit plus haut (**figure 48**), la transfection avec l'ARN FD-L pourrait aboutir à l'inhibition d'une molécule d'ADN fille et à une déplétion de l'ADNmt. Si le mode de réplication changeait à ce moment là et devenait asynchrone, on pourrait imaginer que l'ARN FD-L ne puisse plus cibler le brin H de l'ADNmt devenu moins accessible car recouvert de protéines SSB ou d'ARN endogènes dans le cas du mode de réplication RITOLS (Holt, 2009) (Paragraphe I.3.2.5 de l'introduction, **Figure 8**). La retransfection simultanée avec les ARN FD-L et FD-H aboutissant à une stabilisation de la baisse d'hétéroplasmie, on peut supposer

que lors de la première transfection les deux ARN ciblent les deux brins de l'ADNmt, inhibant la production des deux molécules filles alors qu'après la deuxième transfection seul l'ARN FD-H ciblant le brin L pourrait avoir un effet sur la réplication. Il sera donc intéressant d'essayer de retransfecter les cellules cette fois-ci avec l'ARN FD-H seul.

Le moment de la retransfection pourrait également être important. En effet, la stabilisation du taux d'hétéroplasmie a été obtenue par une retransfection au moment du taux le plus bas. On peut imaginer que le mode de réplication n'ait pas encore changé à ce moment là ce qui permettrait aux deux ARN de continuer à cibler les deux brins de l'ADNmt répliqué selon le mode synchronisé. L'ensemble de ces considérations pourraient être utiles pour l'optimisation du protocole expérimental permettant de stabiliser la baisse d'hétéroplasmie.

#### **4 La baisse d'hétéroplasmie est-elle suffisante pour restaurer les fonctions respiratoires de la cellule?**

Finalement, il sera important de déterminer si la baisse d'hétéroplasmie de 20 à 35% observée est suffisante pour restaurer les fonctions respiratoires de la cellule. Des études induisant un shift d'hétéroplasmie de 10% par un traitement des cellules avec des corps cétoniques ont montré que cette baisse était suffisante pour restaurer les fonctions de la mitochondrie (Santra et al, 2004). Les cellules que nous avons utilisées sont asymptomatiques, ce qui nous a permis de modéliser la stratégie anti-génomique. En effet, les cellules cybrides étant immortalisées, elles sont un modèle facilement manipulable mais ne reflètent pas forcément les conditions physiologiques réelles. Un taux d'hétéroplasmie délétère chez le patient peut ainsi ne déclencher aucun phénotype dans les cellules cybrides. De plus, ces cellules étant cancéreuses, elles reposent en majorité sur la glycolyse pour la production de l'ATP. Il se pourrait donc qu'il ne soit pas possible de sélectionner les cellules aux fonctions respiratoires restaurées. Pour se rapprocher d'un système plus représentatif des conditions physiologiques, des fibroblastes ou un modèle animal pourrait être envisagé. Les souris « Mito-mice » porteuses d'une délétion de l'ADNmt hétéroplasmique et présentant des symptômes proches du syndrome de Pearson pourraient ainsi être utilisées pour tester l'effet des ARN (Nakada et al, 2004). Le mode d'administration de ces derniers pourrait se faire de façon systémique par intraveineuse comme cela est en train de se développer pour les ARN interférents (Vaishnaw et al, 2010). Les cellules pourraient également être traitées *ex vivo* par

une transfection directe avec les ARN, ou par transfection virale du gène des ARN, puis réimplantées dans le tissu affecté du patient.

En conclusion, le travail effectué au cours de cette thèse a permis de modéliser un nouvel essai de thérapie génique pour les maladies mitochondriales, et bien que les applications médicales décrites ici restent lointaines, son optimisation dans le futur pourrait aboutir à une alternative prometteuse pour traiter les maladies mitochondriales causées par des mutations dans l'ADNmt, et pour lesquelles aucun traitement n'est disponible aujourd'hui.

# **MATERIEL ET METHODES**



# I Matériel

## 1 Lignées cellulaires

### 1.1 Souches bactériennes

- Cellules *E. Coli* LyoComp GT116 (*InvivoGen*) :  $F^-$  *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ *M15*  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *endA1*  $\Delta$ *dcm*  $\Delta$ *sbcC-sbcD*
- Cellules *E. Coli* XL1 Blue(*Stratagen*) : (*recA1* *endA1* *gyrA96* *thi-1* *hsdR17* *supE44* *relA1* *lac* [F' *proAB* *lacIqZ.M15* Tn10 (Tetr)])

### 1.2 Lignées cellulaires humaines

- Cellules HepG2 : cellules d'hépatocarcinome humain, fournies par R.N. Lightowlers, Newcastle. Med . Sch., Royaume-Uni
- Cellules 143B.TK- : cellules d'ostéocarcinome, fournies par E.A Shoubridge, Montreal Neurologic Institute, Canada
- Cellules cybrides TSFRmt : cellules résultant de la fusion de cellules 143B.TK- rho0 avec les cellules de fibroblastes énucléés d'un patient porteur d'une délétion de 7075 bases dans l'ADNmt, fournies par A. Lombes, CRICM, Paris

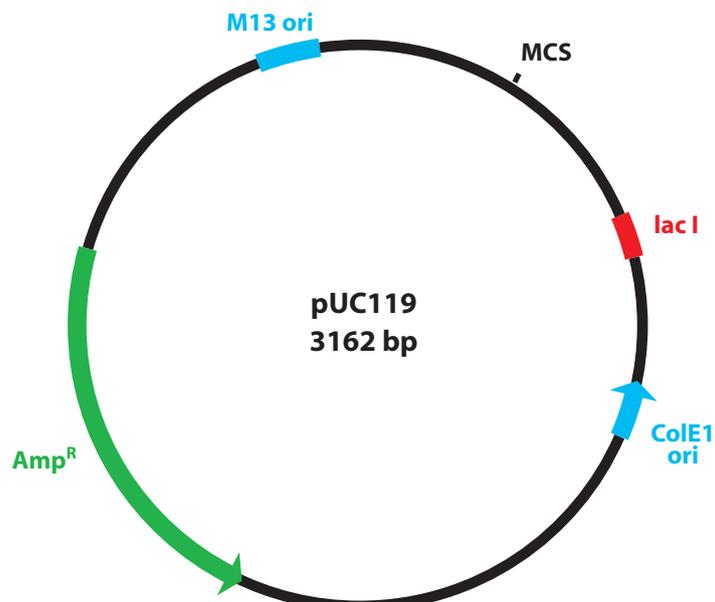
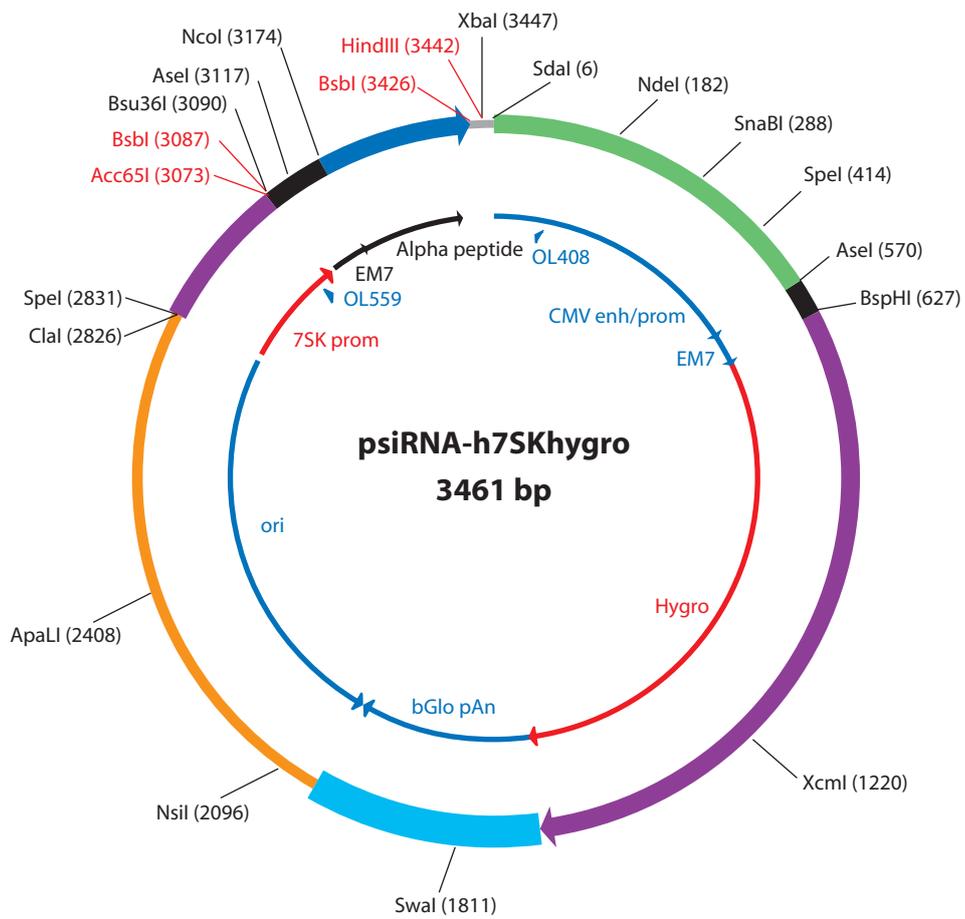
## 2 Milieux de culture

### 2.1 Milieu pour les souches bactériennes

Les cellules *E. Coli* sont cultivées dans du milieu LB (*Lysogeny Broth, Luria-Bertrani*) (bactotryptone 10g/l, extrait de levure 5g/l, NaCl 5g/l). La sélection des bactéries transformées avec le plasmide psiRNA-h7SK s'est faite en présence de 20 $\mu$ g/ml d'hygromycine. La sélection des clones blancs/bleus s'est faite en présence de 80 $\mu$ g/ml de X-Gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-galactopyranoside) et de 0,2mM d'IPTG (isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside).

### 2.2 Milieu pour les lignées humaines

Les cellules sont cultivées dans le milieu « *Dubelcco's Modified Eagle's Medium* » ou DMEM (*Sigma*) contenant 4,5g/l de glucose et préparé selon les directives du fabricant,



**Figure 49: Cartographie des plasmides psiRNA-h7SK et pUC119**

auquels sont ajoutés 10% de sérum de veau fœtal (*Gibco*) (décomplémenté à 50°C pendant 20 min) en présence d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline, 50µg/mL de streptomycine). L'agent tampon est le bicarbonate de soude à 3,7g/L.

Les cellules sont transfectées dans du milieu OptiMEM Reduced Serum (*Invitrogen*)

### 3 Plasmides

- Vecteur psiRNA-h7SK : vecteur construit pour l'expression de shRNA (short hairpin RNA) sous le contrôle du promoteur 7SK de la polymérase III. Le gène *hph* de *E.Coli* lui confère une résistance à l'hygromycine B. Il est situé sous le contrôle du promoteur CMV (cytomegalovirus) en tandem avec le promoteur bactérien EM7 permettant la sélection dans les cellules humaines et dans *E.Coli*. La cassette de clonage est flanquée du peptide  $\alpha$  LacZ permettant la sélection entre les clones parentaux bleus et les transformants blancs.
- Vecteur pUC119 : vecteur utilisé pour le clonage des séquences de l'ADNmt correspondant aux nucléotides 15251 à 15680 (région du gène du cytochrome b) et aux nucléotides 8099 à 8365 et 15438 à 15680 (région entourant les bornes de la délétion). Ces deux plasmides recombinants ont servi à la production des produits de PCR utilisés pour le test de répllication *in vitro* et les expériences de Southern.

### 4 Supports chromatographiques utilisés pour la séparation des protéines

- Sephacryl S-200 (*Amersham-Pharmacia*) : gel filtration ; volume de colonne 130ml ; spectre de séparation de 5kDa à 250kDa ; tampon utilisé : TBS pH7,5 ; PMSF 0,1mM
- MonoQ (*Amersham-Pharmacia*) : HiTrap Q ; volume 1mL ; tampon utilisé : Tris HCl 20mM pH7,5 ; NaCl 150mM ; élution jusqu'à NaCl 3M.
- Phosphocellulose PII (*Whatman*) : Echangeuse de cations (1,5X 10cm). Tampon utilisé : tampon A : 20mM Tris-HCl, pH8.0, 20 mM EDTA, 10% Glycerol, 14 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, additionné de 0,3M et 0,6M de NaCl
- Diéthylaminoéthyl cellulose DE52 (*Whatman*) : Echangeuse d'anions (1X 20cm). Tampon utilisé : tampon A : 20mM Tris-HCl, pH8.0, 20 mM EDTA, 10% Glycerol, 14 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF, additionné de 70mM et 0,3M de NaCl.

## 5 Outils informatiques

- **Mfold** : programme utilisé pour modéliser la structure secondaire d'un ARN  
<http://mfold.bioinfo.rpi.edu/>
- **BLAST** : programme utilisé pour l'alignement de séquences nucléotidiques  
<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>
- **Oligocalc** : programme utilisé pour le calcul de température de fusion des oligonucléotides <http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html>
- **MITOMAP** : Base de donnée du génome mitochondrial humain  
<http://www.mitomap.org/MITOMAP>

## II Méthodes

### 1 Techniques relatives aux cellules humaines

#### 1.1 Culture des cellules

Les cellules stockées à  $-180^{\circ}\text{C}$  dans l'azote liquide sont décongelées au bain-marie à  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 2min. Un volume de  $300\mu\text{l}$  de DMEM préchauffé à  $37^{\circ}\text{C}$  est ensuite ajouté et les cellules réincubées 1min à  $37^{\circ}\text{C}$ . L'opération est répétée 2X et les cellules sont centrifugées 5min à  $600\times g$ . Le culot est resuspendu dans du DMEM et les cellules mises en culture.

Les cellules sont cultivées dans des puits de  $2\text{cm}^2$ ,  $10\text{cm}^2$  ou des flasques de  $25\text{cm}^2$  et  $75\text{cm}^2$  (Plastique Cell+, *Sarstedt*) dans du milieu DMEM dans un incubateur 100% d'humidité à  $37^{\circ}\text{C}$  et 5%  $\text{CO}_2$ . Pendant leur culture, les cellules arrivant à confluence sont détachées dans du **tampon PBS-EDTA**, centrifugées 5min à  $600\times g$ , et comptées. Pour compter les cellules, un aliquot est mis en suspension dans du DMEM et mélangé à un demi volume de Bleu Trypan (0,4% dans du PBS1X), transférées sur une plaque Kova-slide (*Hycor Biomedical*) et visualisées à l'aide d'un microscope inversé. La quantité de cellules est estimée selon les instructions du fournisseur avant d'être resuspendues dans du DMEM et incubées dans de nouvelles flasques.

Pour leur congélation, les cellules sont décollées au **PBS-EDTA** et centrifugées 5min à  $600\times g$ . Le culot est resuspendu dans  $300\mu\text{l}$  de sérum de veau fœtal additionné de 10% de DMSO. Les cellules sont ensuite d'abord stockées 24h à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans une boîte Cryo Freezer Block (*Fisher Bioblock Scientific*) puis à  $-180^{\circ}\text{C}$  dans l'azote liquide.

**Tampon PBS 1X** : 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 150 mM NaCl, 3 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,4, (*Sigma*)

**Tampon PBS-EDTA** : PBS 1X ,EDTA 1mM

## 1.2 Transfection de cellules

### 1.2.1 Transfection transitoire

Les cellules utilisées pour la transfection sont cultivées jusqu'à 60% de confluence. Une heure avant la transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu DMEM sans antibiotiques. La transfection est réalisée avec de la lipofectamine (LipofectAMINE 2000, *Invitrogen*), utilisée selon les consignes du fournisseur :

2cm<sup>2</sup>: 1µl lipofectamine, 200ng ARN mélangés dans 200µl d'OptiMEM

10cm<sup>2</sup>: 5µl lipofectamine, 1µg ARN mélangés dans 500µl d'OptiMEM

25cm<sup>2</sup>: 12,5µl lipofectamine, 2,5µg ARN mélangés dans 800µl d'OptiMEM

La lipofectamine est incubée dans du milieu OptiMEM (*Invitrogen*) pendant 15min à T°C ambiante. Un volume égal de milieu OptiMEM contenant l'ARN est ensuite ajouté. Le mélange lipofectamine-ARN est mis à incuber 20 min à T°C ambiante puis ajouté au milieu de culture des cellules cybrides. Le milieu de transfection est remplacé au moins 4h après la transfection par du DMEM. Les cellules sont récupérées dans du tampon PBS-EDTA au minimum 24h après la transfection. Les cellules sont centrifugées 5 min à 600xg. Le culot sec est stocké à – 80°C.

Le taux de transfection des cellules a été évalué par FACS en collaboration avec Fanny Monneaux à l'institut de biologie moléculaire et cellulaire de Strasbourg.

### 1.2.2 Transfection stable

Les cellules cybrides ont été transfectées avec le plasmide psiRNA contenant les gènes des ARN F1D1, FD-L et FD-H. Pour cela, 1µg de plasmide a été incubé avec 10µl de lipofectamine (*Invitrogen*) dans 500µl d'OptiMEM. Le mix de transfection a ensuite été ajouté aux cellules cybrides à 80% de confluence dans des puits de 10cm<sup>2</sup> contenant 1,5mL d'OptiMEM. Les complexes ont été enlevés après 6h d'incubation et remplacés par du milieu DMEM. La sélection des cellules transfectées a commencé 48h après la transfection en ajoutant 200µg/ml d'hygromycine. La sélection s'est faite pendant 2 semaines, jusqu'à ce que les cellules contrôles non transfectées se soient détachées. Des clones ont été produits en diluant les cellules résistantes à l'hygromycine de telle façon à ne déposer qu'une cellule par puit d'une plaque de 96 puits.

## 2 Techniques spécifiques aux acides nucléiques

### 2.1 Extraction des acides nucléiques des cellules humaines

#### 2.1.1 Extraction de l'ADN total

Pour isoler l'ADN total des cellules humaines, ces dernières sont détachées dans du PBS-EDTA et centrifugées 5min à 600xg. Le culot cellulaire est solubilisé dans 0.5mL de **tampon RSB** additionné de 10ul de protéinase K à 20mg/mL et incubé 2h à 50°C. 50ul de NaCl 5M sont ensuite ajoutés et l'ADN est précipité dans 500mL d'isopropanol à -20°C pendant la nuit. L'ADN est centrifugé à 13000 rpm à 4°C pendant 30min, le culot lavé à l'éthanol 70% et dissout dans 50ul de TE.

**tampon RSB** : 10 mM Tris-HCl, pH7.5, 10 mM NaCl, 25 mM Na-EDTA and 1% SDS

#### 2.1.2 Extraction de l'ARN

Pour extraire l'ARN des cellules elles sont détachées avec du **tampon PBS-EDTA**, centrifugées à 600xg pendant 5 min et le culot lysé dans 500µl de TRIzol Reagent (*Invitrogen*). Après 5min, 100ul de chloroforme sont ajoutés, le milieu mixé, incubé 3min à T°C ambiante et centrifugé 15min, 8°C à 12000xg. La phase supérieure est récupérée, mélangée à 420ul d'isopropanol et précipitée à -20°C pendant la nuit. Les ARN sont ensuite centrifugés 30min à 13000rpm, lavés dans de l'éthanol 80% puis 100%, séchés et repris dans 20ul d'eau stérile.

#### 2.1.3 Extraction des ARN mitochondriaux

Les mitochondries sont isolées à partir de 50 cm<sup>2</sup> de cellules cybrides. Les cellules sont récupérées dans du **tampon PBS-EDTA**, centrifugées 10 min à 600xg et le culot obtenu resuspendu dans 1 ml de tampon MB. Un dixième de la préparation est prélevée pour isoler les ARN totaux. Les cellules sont cassées par passage une quinzaine de fois à travers l'aiguille d'une seringue (0,6x25 mm, *N16 Terumo Neolus*). Le lysat est centrifugé à 600xg pendant 5min et le surnageant récupéré. Le culot de cellules est quant à lui resuspendu dans du **tampon MB** pour être soumis à une nouvelle étape de broyage. Le volume total de surnageant récupéré est centrifugé 10 min à 13000 rpm et le culot de mitochondries repris dans 300µl de

**tampon MB.** Pour dégrader les ARN non-mitochondriaux 300µl de **RNase 2X** sont ajoutés et laissés à agir 7 min à température ambiante. Le milieu est ensuite dilué dans dix volumes de **solution RNase STOP** et centrifugé 5min à 12000xg. Le culot est repris dans 300 µl de **tampon MB** et 30µl de digitonine à 1mg/mL sont ajoutés pour générer des mitoplastes (mitochondries dépourvues de membranes externes). L'incubation se fait à température ambiante pendant 7 min. Après dilution dans 2 volumes de **tampon MB**, le milieu est centrifugé à 13000rpm 10 min à 4°C. Après avoir été lavé 3 fois, le culot de mitochondries, ainsi que les cellules stockées pour l'extraction des ARN totaux, sont lysés dans 500µl de Trizol (*Invitogen*) (Voir II ;2.1.1, Matériel et méthodes).

**tampon MB** : Sorbitol 0,6M; EDTA 1mM; Na-Pipes 10mM p6,7

**Rnase 2X**: Rnase A 10ug/mL; MgCl<sub>2</sub> 4mM; tampon MB

**solution RNase STOP**: 2,5mM EDTA dans du tampon MB

## 2.2 Amplification de l'ADN

### 2.2.1 Amplification par PCR

La PCR consiste à amplifier, de manière spécifique et en grande quantité, un fragment d'ADN à l'aide d'un couple d'amorces oligonucléotidiques simple-brin spécifique. La réaction de polymérisation a été effectuée dans un volume final de 100µl comprenant l'ADN-cible (40ng), les quatre dNTP (0,25mM de chaque), les deux amorces spécifiques (0,5µM chacune), le tampon dépendant de l'enzyme utilisée, et 2,5 unités de polymérase (Econotaq, *Lucigen*). Le tout est porté à une température de 94°C, afin de dénaturer l'ADN, puis subit plusieurs cycles de dénaturation (94°C), hybridation des amorces sur l'ADN (de 42 à 55°C selon le programme) et élongation (72°C). L'ADN amplifié est ensuite analysé par électrophorèse sur gel d'agarose 0.8% ou sur gel de polyacrylamide 10% natif, les fragments découpés et extraits du gel par le kit QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*).

### Amorces

<b>FD-rev</b>	AAGAGCCCTGTAGGG
<b>HD-rev</b>	GAGAACTAAGCACTG
<b>HF-rev</b>	TGGAGCCCTGTAGGG
<b>Prom T7</b>	GGGATCCATAATACGACTCACTATA

## Oligonucléotides

Les oligonucléotides ci-dessous ont servi de matrice pour l'amplification des produits de PCR utilisés pour la transcription des ARN recombinants. La séquence du promoteur T7 est soulignée.

Nom	Séquence	Amorces
<b>F1D1</b>	<u>TAATACGACTCACTATAGCGCAATCGGTAGCGCTT</u> GAGCCCCCTACAGGGCTCT T	Prom T7 FD-Rev
<b>FD-L</b>	<u>TAATACGACTCACTATAGCGCAATCGGTAGCGCCTCTTTACAGTGCTTAGTTCTC</u> GAGCCCCCTACAGGGCTCTT	Prom T7 FD-Rev
<b>FD-H</b>	<u>TAATACGACTCACTATAGCGCAATCGGTAGCGCAGTAAGCACTGTAAATGAGCC</u> CCCTACAGGGCTCTT	Prom T7 FD-Rev
<b>D22</b>	<u>TAATACGACTCACTATAGCGCAATCGGTAGCGCCTCTTTACAGTGCTTAGTTCTC</u>	Prom T7 HD-rev
<b>21F</b>	<u>TAATACGACTCACTATAGGTCTTTACAGTGCTTACTTCTCGAGCCCCCTACAGGG</u> CTCCA	Prom T7 HF-Rev
<b>FD22</b>	<u>TAATACGACTCACTATAGGCGCAATCGGTAGCGCGTGAGCCCCCTACAGGGCTC</u> CTCTTTACAGTGCTTAGTTCTC	Prom T7 HD-rev
<b>ARN TFV</b>	<u>TAATACGACTCACTATAGCGCAATCGGTAGCGCTCTCTCTCTCTCTCTCTC</u> GAGCCCCCTACAGGGCTCTT	Prom T7 FD-Rev
<b>21FD</b>	<u>TAATACGACTCACTATAGGTCTTTACAGTGCTTAGTTCTCGCGCAATCGGTAGCG</u> CTTGAGCCCCCTACAGGGCTCCA	Prom T7 HF-Rev
<b>ARN contrôle</b>	<u>TAATACGACTCACTATACGCAAATGGCTTTATGCCGATTGCGTCACAAGCTGGC</u> GCCTCACAGTGCTTAGTTCTC	Prom T7 HD-rev

### 2.2.2 Mesure du taux d'hétéroplasmie des cellules cybrides par PCR quantitative en temps réel

La PCR quantitative en temps réel consiste à suivre l'amplification d'un acide nucléique cible au cours du temps. Les quantités présentes dans chaque extrait initial sont ensuite calculées à partir de la cinétique d'amplification. Le suivi de l'amplification de l'ADN a été réalisé par l'intermédiaire d'un agent intercalant, le SYBR Green (*Biorad*) qui émet de la fluorescence lorsqu'il s'associe aux molécules d'ADN double brin produit pendant la réaction de PCR. La fluorescence est ainsi directement corrélée à la quantité d'ADN double brin présente dans le milieu réactionnel. A partir de la courbe d'amplification, le cycle seuil (Ct) est déterminé. Il correspond au cycle de PCR à partir duquel la fluorescence émise par le SyBR Green présent dans l'échantillon dépasse le bruit de fond déterminé par la ligne de

base. Au cycle seuil, la quantité d'ADN amplifiée est proportionnelle à la quantité initiale d'ADN présente dans l'échantillon.

Le protocole permettant de calculer le taux d'hétéroplasmie dans les cellules cybrides porteuses de la délétion de 7075 pb a été élaboré dans le laboratoire de A. Lombes, (*CRICM, Paris*).

Deux couples d'amorces ont été utilisés :

Le couple d'amorces 1095 F et 1305B amplifie un fragment de 210 pb correspondant à une zone de l'ADNmt contenu dans le gène de l'ARNr 12S (nucléotides 1095 à 1305). Cette amplification permet d'amplifier à la fois l'ADNmt sauvage et muté et donc d'évaluer le taux d'ADNmt total.

Le couple d'amorces 11614F et 11778B amplifie un fragment de 164 pb correspondant à une zone de l'ADNmt contenue seulement dans l'ADNmt sauvage (nucléotides 11778 à 11614).

### Amorces qPCR

<b>1095 F</b> <b>1305B</b>	TAGCCCTAAACCTCAACAGT TGCGCTTACTTTGTAGCCTTCAT	Amplification d'une région du gène de l'ARNr 12S
<b>11614F</b> <b>11778B</b>	CATTGCATACTCTTCAATCAGC CGACTGTGAGTGCGTT	Amplification d'une région dans la délétion

Les amplifications ont été réalisées par le thermocycleur MyiQ (*Biorad*) et les analyses ont été opérées grâce au logiciel MyiQ<sup>TM</sup> Real-Time PCR Detection System Software Version 1.0 (*Biorad*). Les réactions de PCR ont été réalisées dans 20 µL de milieu réactionnel composé de 3µL d'H<sub>2</sub>O, 1µL d'amorce 1095 F ou 11614F à 10pmoles/µL, 1µL d'amorce 1305B ou 11778B à 10pmoles/µL, 10µL de iQ Syber Green SuperMix (*Biorad*) et 5µL d'ADN total dilué 100X (environ 5ng). L'amplification commence par l'activation de la polymérase 10min à 95°C, suivie de 40 cycles constitués d'une phase de dénaturation 30 secondes à 95°C, d'une phase d'hybridation des amorces 30 secondes à 60°C et d'une phase d'élongation 1min à 72°C.

La quantification absolue du nombre de copies d'ADNmt sauvage et délété dans les échantillons d'ADN total est réalisée grâce à une gamme étalon construite dans le laboratoire de A.Lombes (*CRICM, Paris*). Pour cela, des fragments d'ADNmt correspondant aux

nucléotides 109 à 1714 (région du gène de l'ARNr 12S) et aux nucléotides 10739-11839 (région contenue dans la délétion) ont été clonés dans un plasmide pUC119. Chaque plasmide linéarisé a été utilisé en dilution de  $10^7$  à  $10^4$  copies par puit et amplifié avec les amorces 1095 F /1305B soit 11614F/11778B. Chaque réaction à partir d'un même échantillon d'ADN est réalisée en triplicat et la déviation standard calculée par le logiciel MyiQ™. Si la déviation standard entre les trois cycles seuil du triplicat est inférieure ou égale à  $2.10^{-1}$ , le nombre de copies d'ADNmt total ou sauvage est calculé.

La formule permettant de calculer le taux d'hétéroplasmie est la suivante :

$$(\text{ADNmt délété})/(\text{ADNmt total})=[1-[(\text{ADNmt sauvage})/(\text{ADNmt total})]]\times 100$$

Le référentiel à 0% d'hétéroplasmie est calculé à partir d'un échantillon d'ADN total extrait de cellules 143B sauvages.

## 2.3 Synthèse d'ARN

### 2.3.1 T7 transcription *in vitro*

La T7 transcription est effectuée avec le kit T7 RiboMax Express Large Scale RNA Production System (*Promega*). Pour cela, 8ul de produit de PCR non purifié sont incubés à 10ul de tampon RiboMax Express T7 2X et 2ul de mix d'enzyme (Polymerase ARN T7, RNasin Ribonuclease inhibitor et pyrophosphatase inorganique). Le milieu de réaction est incubé pour la nuit à 37°C, mélangé à 10ul de **tampon de charge STOP** et déposé sur gel d'acrylamide 12%, urée 8M, TBE1X. Les bandes correspondant aux transcrits sont visualisées sous UV et découpées. Les morceaux de gel sont incubés avec 600ul de **tampon d'élution** et 60ul de phénol acide sous agitation (2000 rpm) pendant la nuit à 4°C. L'éluat est ensuite précipité dans 3V d'éthanol 100% et  $1/10^{\circ}$  d'acetate de sodium.

**tampon de charge STOP** : 98% (v/v) formamide ; EDTA 5mM ; bleu de xylène-cyanol 0,02% ; bleu de bromophénol 0,02%

**tampon d'élution** : Acétate de sodium 0,5M ; acétate de magnésium 10mM ; EDTA 0,1mM ; SDS 0,1%

### 2.3.2 T7 transcription d'ARN marqué par un fluorophore

L'ARN F22 est transcrit en présence d'uridine liée au fluorophore Alexa Fluor 488 (ChromaTide® Alexa Fluor® 488-5-UTP, *Invitrogen*). Toute les étapes sont réalisées dans des tubes opaques. Le milieu de réaction est le suivant : 1µl d'ATP 10mM, 1µl de CTP 10mM, 1µl de GTP 10mM, 0,75 µl d'UTP 10mM, 2,5 µl de ChromaTide® Alexa Fluor® 488-5-UTP 1mM, 4µl de tampon de transcription 5X (*Promega*), 2 µl de DTT 100mM, 1µl de Rnase OUT 40U/µl (*Invitrogen*), 2µl de produit de PCR F22 à 700ng/µl, 0,5 µl de T7 RNA polymerase 80U/µl (*Promega*), H<sub>2</sub>O qsp 20µl.

Le milieu est incubé pendant la nuit à 37°C puis dilué dans 200µl d'eau stérile et 200µl de phénol. Après centrifugation 10min, 13000rpm à 4°C, la phase supérieure est prélevée et ajoutée à 3V d'éthanol 100% et 1/10<sup>e</sup> de volume d'acétate de sodium 3M. Après précipitation à -20°C pendant la nuit, l'ARN est précipité, lavé et repris dans 20µl d'eau stérile. Le dosage de l'ARN et l'estimation du nombre de fluorophores par molécule d'ARN est réalisée par spectrophotométrie en comparant l'absorbance du fluorophore à 492nm et celle des bases azotées à 260nm (Nanodrop, *Thermo Fisher Scientific*). Le nombre de molécules d'uridine marquée est d'environ 1,45 par molécule d'ARN.

## 2.4 Séparation électrophoretique des acides nucléiques

### 2.4.1 Electrophorèse sur gel d'agarose

Les molécules d'ADN peuvent être séparées en fonction de leur taille par migration électrophorétique sur gel agarose. L'ADN est chargé (1/3 de volume de **tampon de charge**) sur un gel d'agarose (entre 0.8% et 2% (p/v)) dans du **tampon TAE 1x**. La migration de l'ADN s'effectue sous une tension de 100 V. Les fragments d'ADN sont ensuite visualisés sous UV grâce au bromure d'éthidium incorporé dans le gel (0,5 µg/mL).

**Tampon TAE 1X** : 40mM Tris-acetate pH 8, 1mM EDTA

**Tampon de charge** : Glycérol 30% (v/v), xylène cyanol 0,25% (p/v), bleu de bromophénol 0,25% (p/v)

**Echelle** : 1kb plus DNA Ladder (*Invitrogen*)

## 2.4.2 Electrophorèse native sur gel de polyacrylamide

Les produits de PCR servant de matrice à la transcription des ARN ainsi que les transcrits T7 sont chargés dans 1/3 de volume de **tampon de charge** sur gel polyacrylamide 10% **TAE 1X**. La migration s'effectue dans le **tampon TAE 1X**. Les fragments d'ADN sont ensuite visualisés sous UV (G Box, *Syngene*) après avoir incubé le gel dans un bain de bromure d'éthidium à 1 $\mu$ g/mL. Les transcrits T7 ont ensuite été transférés sur membrane Hybond par la technique du Northern (Paragraphe II.2.6.2 de la partie Methodes)

## 2.4.3 Electrophorèse dénaturante sur gel de polyacrylamide

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 bisacrylamide (19/1) à 40% dans du **tampon TBE 1X** et 8 M d'urée. La polymérisation du gel est catalysée par l'addition d'APS (0,1% (p/v)) et de TEMED (0.035% (v/v)). Avant dépôt, les acides nucléiques sont additionnés d'un volume de **tampon de charge STOP** et chauffés à 90°C 3 min. 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 acides nucléiques sont ensuite visualisés par autoradiographie sur plaque phosphorimager et analysés en utilisant les programmes Typhoon TRIO et ImageQuantTL (*GE Healthcare*) s'ils sont marqués radioactivement ou sous UV après coloration du gel dans un bain de bromure d'éthidium à 1 $\mu$ g/mL (Gbox, *Syngene*).

**tampon de charge STOP** : 98% (v/v) formamide ; EDTA 5mM ; bleu de xylène-cyanol 0,02% ; bleu de bromophénol 0,02%

**tampon TBE 1X** : Tris-borate 45mM ; EDTA 1mM ; pH 8,3

## 2.5 Marquage des acides nucléiques en 5'

### 2.5.1 Marquage des sondes oligonucléotidiques

Cinquante pmol d'oligonucléotide sont incubés à 37°C pendant 45 min en présence de 2  $\mu$ l de tampon 10X (*Promega*), de 1,5  $\mu$ l de  $\gamma$ -ATP (10mCi/mL ; 5000 Ci/mmmole), de 1U de Polynucleotide Kinase (*Promega*) pour un volume final de 20  $\mu$ l 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 0,2M**. Les oligonucléotides sont élués avec 6 ml de **tampon STE 1M**. L'éluat est ensuite stocké à  $-20^{\circ}\text{C}$  en présence d'un volume égal de **tampon de pré-hybridation**.

**tampon STE 1M**: 10mM Tris-Cl, pH 7,5 ; 1M NaCl ; 1mM EDTA

**tampon STE 0,2M** : 10mM Tris-Cl, pH 7,5 ; 1M NaCl ; 1mM EDTA

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

## 2.5.2 Marquage de l'ARN

Avant d'être marqué en 5', l'ARN doit être déphosphorylé. Pour cela, 2  $\mu\text{g}$  d'ARN sont mis à incuber pendant 40min à  $37^{\circ}\text{C}$  en présence de 40 U de RNasine (*Promega*), 2,5  $\mu\text{l}$  de tampon 10X (*Promega*) ainsi que 1U de phosphatase alcaline (*CIP*, *NEBiolabs*) dans un volume réactionnel de 25  $\mu\text{l}$ . L'ARN est extrait par addition de 25  $\mu\text{l}$  d'eau stérile et 50  $\mu\text{l}$  de phénol, vortexé puis centrifugé 5min à 12000xg. La phase aqueuse est récupérée et l'ARN précipité, lavé et dissous dans 10  $\mu\text{l}$  d'eau stérile.

Pour être marqué, 0,7  $\mu\text{g}$  d'ARN dephosphorylé sont chauffés 1 min à  $90^{\circ}\text{C}$ , puis incubés 40 min à  $37^{\circ}\text{C}$  en présence de 40U de Rnasine (*Invitrogen*), 2  $\mu\text{l}$  de tampon 10X (*Promega*), 10U de T4 Polynucléotide kinase (*Promega*) ainsi que 3  $\mu\text{l}$  de  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (10  $\mu\text{Ci}/\mu\text{l}$  ; 3000Ci/mmmole) dans un volume réactionnel de 20  $\mu\text{l}$ . Après addition du **tampon de charge dénaturant**, l'ARN est mis à migrer sur gel d'acrylamide 8%, urée 8M, TBE 1X à 250V, 20mA. Le marquage est révélé par autoradiographie et l'ARN non dégradé est élué du gel sous agitation à  $4^{\circ}\text{C}$  dans du **tampon d'éluion** et 10% de phénol durant la nuit. Enfin l'ARN est précipité dans 3 volumes d'éthanol 100%, 1/10<sup>e</sup> d'acétate de sodium 3M lavé, dissous dans de l'eau stérile et stocké à  $-80^{\circ}\text{C}$ .

**tampon de charge dénaturant** : 98% (v/v) formamide ; EDTA 5mM ; bleu de xylène-cyanol 0,02% ; bleu de bromophénol 0,02%

**tampon d'éluion** : Acétate de sodium 0,5M ; acétate de magnésium 10mM ; EDTA 0,1mM ; SDS 0,1%

## 2.6 Hybridation moléculaire des acides nucléiques

### 2.6.1 Southern blot

Les produits de PCR, les plasmides ainsi que l'ADNmt sont déposés sur gel d'agarose à raison de 1 $\mu$ g par piste. Après migration le gel est incubé 45min à T°C ambiante dans une **solution de dénaturation** puis 30min toujours à T°C ambiante dans une **solution de renaturation** et encore une fois 15min. Le transfert passif est réalisé à l'aide d'un **tampon de transfert ADN** sur membrane Hybond-N pendant la nuit. Après transfert la membrane est lavée dans du **SSC 6X** pendant 5min puis fixée sous UV.

La membrane est ensuite préhybridée à 65°C pendant 1H30, lavée 2 fois dans du **tampon PBS-EDTA** et hybridée pendant la nuit avec les ARN marqués au P32 dans du **PBS** à 37°C.

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

**solution de dénaturation** : 1.5M NaCl ; 0.5M NaOH

**solution de renaturation** : 1M Tris HCl pH 7.4 ; 1.5M NaCl

tampon de transfert ADN: 10XSSC

### 2.6.2 Northern Blot

#### 2.6.2.1 Transfert des ARN

Les ARN dissous dans 10  $\mu$ l d'eau stérile sont chauffés 3 min à 90°C dans un demi volume de **tampon de charge STOP** et déposés sur gel à 10% de polyacrylamide, urée 8M, **TBE 1X**. Après migration, le gel est incubé 2 min dans du **tampon de transfert ARN** additionné de BET (1  $\mu$ g/ml) et les acides nucléiques visualisés sous UV (G-BOX, Syngene). Le gel est ensuite incubé 15 min dans du tampon de transfert puis soumis à un électrotransfert sur membrane Hybond N (*Amersham-Pharmacia*) 6h à 4°C, 10V, 100mA dans du **tampon de transfert ARN**.

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

### 2.6.2.2 Hybridation de la sonde

Après le transfert des ARN la membrane est séchée et fixée 3 min aux UV puis incubée à 60°C dans une **solution de préhybridation** pendant 1h30. Cette dernière est ensuite remplacée une heure plus tard par la **solution d'hybridation**. Après hybridation pendant 6h à 45°C, la membrane est lavée 3X 10 min à T°C ambiante dans du **tampon de lavage**, scellée et exposée pendant 24h sur une plaque Imaging Plate Fuji BASIII. Les signaux correspondant aux différentes sondes marquées sont révélés par le scanner Typhoon TRIO (*GE Healthcare*) et quantifiés par le programme ImageQuantTL (*GE Healthcare*).

Chaque membrane est hybridée de façon consécutive avec trois sondes ciblant les ARN recombinants, un ARNt mitochondrial et un ARN cytosolique. Avant d'être incubée avec une nouvelle sonde la membrane est deshybridée par lavage à 80°C dans une solution de deshybridation pendant 30 min.

La formule utilisée pour calculer l'efficacité d'import des ARN dans les mitochondries *in vivo* est la suivante :  $[[\text{ARN}]_M / [\text{ARNt mito endogène}]_M] / [[\text{ARN}]_T / [\text{ARNt mito endogène}]_T]$

La formule utilisée pour calculer la quantité d'ARN recombinant dans la fraction d'ARN mitochondriaux est la suivante :  $[\text{ARN}]_M / [\text{ARNt mito endogène}]_M$

M= Fraction d'ARN mitochondriale, T=Fraction d'ARN totale

$[\text{ARN}]_M$ =ARN recombinant présent dans la fraction mitochondriale

$[\text{ARN}]_T$ =ARN recombinant présent dans la fraction totale

$[\text{ARNt mito endogène}]_M$ =ARNt mitochondrial (Leu ou Thr) présent dans la fraction mitochondriale

$[\text{ARNt mito endogène}]_T$ = ARNt mitochondrial (Leu ou Thr) présent dans la fraction totale

**solution de préhybridation** : 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

**SSC 1X** : NaCl 0,15M ; Trisodium citrate 0,015M ; NaOH qsp pH7

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

**solution de deshybridation** : 0,02xSSC, 0,1%SDS

## Sondes oligonucléotidiques

Anti-ARN F1D1, FD-L, FD-H, 21F, 21FD, TRK1, TFV	GAGTCATACGCGCTACCGATTGCGCCAACAAGGC
Anti-ARNr 5,8S	GGCCGCAAGTGCGTTCGAAG
Anti-ARNr 5S	CATCCAAGTACTACCAGGCC
Anti-ARNt <sup>lys</sup> cyto	ACTTGAACCCTGGACC
Anti-ARNt <sup>Leu</sup> mito	GAA CCT CTG ACT GTA AAG
Anti-ARNt <sup>Threo</sup> mito	TCT CCG GTT TAC AAG AC
Anti-ARN HD22, FD22 et ARN contrôle	GAGAACTAAGCACTG

## 2.7 Technique de clonage et séquençage de l'ADN

### 2.7.1 Clonage

#### Digestion des plasmides

Le plasmide psiRNA a d'abord été digéré avec les enzymes HindIII et Acc 65 et le plasmide pU119 avec les enzymes EcoRI et HindIII.

2µg de plasmide psiRNA et PUC119 ont été digérés dans 5µl Tampon NEB2 10X, 0.5µl de BSA 100X, 1U de chaque enzyme, H<sub>2</sub>O qsp 50µl pendant 3h à 37°C. Le mix ensuite été déposé sur gel d'agarose 1%, la bande correspondant au plasmide digéré découpée et le plasmide extrait du gel à l'aide du kit QIAquick Gel Extraction Kit (*Qiagen*).

#### Annealing

En parallèle, les séquences à cloner ont été générées en annealant les oligos F1D1 F à F1D1 R, FD-L F à FD-L R, et FD-H F à FD-H R. Pour cela 2µl de chaque paire d'oligo à 25µM ont été incubés à 6µl de NaCl 0.5M, H<sub>2</sub>O qsp 30µl. Le milieu de réaction a été chauffé 2min à 80°C puis la température baissée progressivement jusqu'à 35°C.

## Oligonucléotides utilisés pour l'annealing

Les sites de restriction sont soulignés.

<b>F1D1 F</b>	<u>GTACCTCGCGCAATCGGTAGCGCTTGAGCCCCCTACAGGGCTCTTTTTGGAAA</u>
<b>F1D1 R</b>	<u>AGCTTTTCCAAAAGAGCCCTGTAGGGGGCTAAGCGCTACCGATTGCGCGAC</u>
<b>FD-L F</b>	<u>GTACCTCGCGCAATCGGTAGCGCCTCTTTACAGTGCTTAGTTCTCGAGCCCCCTACAGGGC</u> <u>TCTTTTTGGAAA</u>
<b>FD-L R</b>	<u>AGCTTTTCCAAAAGAGCCCTGTAGGGGGCTCGAGAACTAAGCACTGTAAAGAGGGCGCTA</u> <u>CCGATTGCGCGAC</u>
<b>FD-H F</b>	<u>GTACCTCGCGCAATCGGTAGCGCAGTAAGCACTGTAAATGAGCCCCCTACAGGGCTCTTTT</u> <u>TGGAAA</u>
<b>FD-L R</b>	<u>GTACCTCGCGCAATCGGTAGCGCAGTAAGCACTGTAAATGAGCCCCCTACAGGGCTCTTTT</u> <u>TGGAAA</u>

## Production de produits de PCR

Les produits de PCR à liguer dans le plasmide pUC119 sont produits à partir d'un extrait d'ADN total de cellules cybrides avec les amorces CytBwt F/CytBwt R et CytBwt R/Lysmt F.

### Amorces

<b>Cytbwt F</b>	CTTTAAAGCTTCACACGATTCTTTACCTTTC
<b>Cytbwt R</b>	TCTTTGGAATTCGTTTGGATATATGGAGGATGG
<b>Lysmt F</b>	TCATACAAGCTTACAGATGCAATTCCCGGACG

## Ligation

Les oligonucléotides et les produits de PCR annealés ont ensuite été ligués respectivement au plasmide psiRNA et pUC119 digérés. Pour cela, 3µM d'oligonucléotides annealés ou de produit de PCR ont été incubés à 100ng de plasmide, 1U de T4 DNA ligase, 2µl de tampon de ligation 10X dans H<sub>2</sub>O qsp 20µL. L'incubation s'est faite à 16°C pendant la nuit. Les plasmides ligués ont été précipités, lavés et repris dans 10µL d'eau stérile.

### **Transformation de bactéries par électroporation**

50ng de plasmide psiRNA ligué ont été ajoutés à 100µl de bactéries *E. Coli* électrocompétentes LyoComp GT116 (*InvivoGen*) et 50ng de plasmide pUCC19 ligué ont été incubés avec 100µl de bactéries *E.coli* XL1-blue. L'électroporation a été effectuée à 1.5kV, 200 Ω et 25µF dans une cuvette de 0,1 cm (*Gene pulse, Bio-Rad*). Immédiatement après, 900µL de **milieu SOC** ont été ajoutés et transférés dans un nouveau tube mis sous agitation 1h à 37°C. Les bactéries transformées avec le plasmide psiRNA ont ensuite été étalées sur boîte Fast-Media® Hygro Agar (*InvivoGen*) et laissées à 37°C pour la nuit. Les bactéries transformées avec le plasmide pUC119 ont quant à elles été étalées sur milieu LB gélosé additionné d'ampicilline en présence d'IPTG 10mM et de X-Gal 2% (p/v).

**Milieu SOC** : 2% tryptone, 0,5% yeast extract, 10mM NaCl, 2,5mM KCl, 10mM MgCl<sub>2</sub>, 10mM MgSO<sub>4</sub>, 20mM glucose

### **Sélection et amplification du plasmide**

Les clones blancs ont été incubés dans 20ml de milieu LB supplémenté de 20µg/l d'hygromycine (psiRNA) ou d'ampicilline (pUC119) à 37°C pendant la nuit. Les plasmides ont ensuite été extraits à l'aide d'un kit Miniprep PureYield Plasmid System (*Promega*). La vérification du clonage s'est faite par digestion du plasmide psiRNA avec l'enzyme de restriction SpeI produisant une bande à 2417 pb et 791pb puis par séquençage avec l'amorce OL559: CGATAAGTAACTTGACCTAAGTG. Le plasmide psiRNA recombinant a ensuite été amplifié en transformant les bactéries *E.Coli* XL1 blue par électroporation. Pour isoler le plasmide, le kit Jetstar Plasmid Maxiprep (*Genomed*) a été utilisé.

#### **2.7.2 Séquençage**

Les séquences d'ADN ont été réalisées par le service de séquençage de l'IBMP à l'aide d'un appareil « Applied Biosystems 3100 » (*Perkin Elmer*). La méthode repose sur une amplification par PCR asymétrique incorporant des didésoxynucléotides, chacun couplé à un fluorophore possédant une longueur d'onde spécifique. Ainsi, lors de la migration sur gel, les fluorophores sont excités par un laser à argon. Les signaux réémis sont transmis au système informatique et analysés.

Pour le séquençage du plasmide psiRNA, l'amorce OL559 CGATAAGTAACTTGACCTAAGTG a été utilisée.

Pour le séquençage du plasmide pUC119 contenant les fragments d'ADNmt, l'amorce CytBwt F CTTTAAAGCTTCACACGATTCTTTACCTTTC a été utilisée.

### 3 Test de la réplication *in vitro*.

#### 3.1 Préparation de la matrice simple et double brin

La matrice double brin est synthétisée par PCR à partir des fragments d'ADNmt clonés dans le vecteur pUC119. Le fragment WT de 430bp (nucléotides 15251 à 15680 dans le gène du cytochrome b) est amplifié avec les amorces Cytbwt F Cytbwt R. Le fragment MT de 512bp (nucléotides 8099 à 8365 et 15438 à 15680 correspondant aux bornes de la délétion) est amplifié avec les amorces Cytbwt R et Lysmt F (Amorces répertoriées dans le paragraphe II.2.2.1 de la partie Méthodes)

Pour obtenir la matrice simple brin les mêmes PCR sont réalisées en présence d'amorces biotinylées en 5'. Les produits de PCR sont ensuite fixés 20min sous agitation sur billes d'agarose Steptavidine préalablement lavées dans du tampon de lavage. Les billes sont ensuite centrifugées 1min à 9000xg et lavées encore une fois dans le **tampon de lavage**. Elles sont ensuite resuspendues dans 0.1M de NaOH pour dénaturer l'ADN, mises sous agitation 20min et centrifugées à 9000xg 1min. Le surnageant contenant les brins non biotinylés est récupéré et la solution neutralisée avec 0.1M de HCl. L'ADN est précipité à l'éthanol et repris dans de l'eau stérile.

**tampon de lavage:** 2M NaCl; 10mM Tris-HCl pH7.5; 1mM EDTA

#### Amorces biotinylées

<b>KSS-F-bio</b>	biotin-TCAGTAGACAGTCCCACCCTC	Purification du fragment d'ADN simple brin MT forward
<b>WT-F-bio</b>	biotin-ACAGATGCAATTCCCGGACG	purification du fragment d'ADN simple brin WT, forward
<b>R-bio</b>	biotin-GTTTGGATATATGGAGGATGG	purification du fragment d'ADN simple brin WT et MT, reverse

### 3.2 Isolement des enzymes de la réplication

Des mitochondries de foie de bœuf ont été isolées selon les procédures standards (O'Brien & Denslow, 1996). Un gramme de mitochondries est lysé dans du **tampon de lyse** pendant 15min à 4°C. Après centrifugation à 40000xg pendant une heure le surnageant est dilué 1,5 fois dans du **tampon A** et déposé sur une colonne de cellulose DE52 équilibrée avec le même tampon additionné de 70mM de NaCl. Le flow-through représente la fraction I, le pic principal élué avec le tampon A et 0.3M de NaCl correspond à la fraction II. Cette dernière a été soumise à un second fractionnement sur une colonne de phosphocellulose PII équilibrée avec le **tampon A** et 0.3M de NaCl. Le flow through constitue la fraction III et le pic principal élué avec le tampon A et 0.6M de NaCl correspond à la fraction IV. Les quatre fractions ont ensuite été dialysées contre du **tampon de dialyse**.

**tampon de lyse** : 20mM Tris-HCl, pH8.0, 0.1M NaCl, 20mM EDTA, 10% glycerol, 14mM 2-mercaptoethanol, 1% Triton X-100 (v/v), 1mM PMSF, 0.1mM DIFP

**tampon A** : 20mM Tris-HCl, pH8.0, 20 mM EDTA, 10% Glycerol, 14 mM 2-mercaptoethanol, 1 mM PMSF

**tampon de dialyse**: 50% glycerol; 20mM Tris HCl pH8; 0.2mM EDTA; 1mM PMSF; 14mM 2-mercaptoethanol

### 3.3 Recherche de l'activité polymérase dans les fractions protéiques

L'activité de la polymérase a été testée en incubant 2 $\mu$ g de protéines de chaque fraction avec de l'ADN simple brin, de 33 pmoles [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] dCTP en présence ou en absence d'amorces aléatoires pdN<sub>6</sub> (*Promega*) dans du tampon de réplication pour un volume total de 10 $\mu$ l. Le test est réalisé à 37°C pendant une heure. L'ADN est ensuite précipité au TCA 10% sur du papier Whatman et la radioactivité mesurée au compteur à scintillation (*Isotec*).

### 3.4 Test de réplication

Pour le test de réplication 100ng d'ADN simple ou double brin sont mixés avec 50 pmoles d'amorces Cytbwt F/Cytbwt R ou Cytbwt R/Lysmt F dans du **tampon TE**, chauffés à 90°C et progressivement renaturés à 37°C. Le mélange est ensuite incubé avec du **tampon de réplication** et 0.5 $\mu$ l (0.74 $\mu$ g/ $\mu$ l) de la fraction protéique II dans un volume total de 10 $\mu$ l. La

réaction est réalisée en présence de quantités variables d'ARN recombinants à 37°C pendant 1h. La réplication est ensuite arrêtée par addition de 10ul de 0.2% de SDS et 20ul de phénol saturé en TE. Après déprotéinisation, l'ADN est précipité à l'éthanol et analysé sur un gel de polyacrylamide 8% dénaturant.

**tampon de réplication** : 20 mM Tris-HCl, pH7.5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 75 mM KCl, 0.1 mg/ml of BSA, 1 mM 2-mercaptoethanol, 100 µM de chaque ATP, GTP, CTP and UTP, 100 µM de chaque dATP, dGTP, dTTP, 33.3 pmoles de [α-32P]-dCTP (Perkin Elmer, 3000 Ci/mmmole).

**tampon TE** : 10 mM Tris-HCl, pH7.5, 1mM EDTA

## 4 Test d'importation *in vitro*

### 4.1 Purification des facteurs protéiques pour les tests d'import *in vitro*

Les protéines sont extraites à partir de 9 flasques de 75cm<sup>2</sup> de cellules HepG2 arrivées à 100% de confluence. Pour cela, les cellules sont détachées dans du **PBS-EDTA** pendant 15min à 37°C puis centrifugées 10 min à 600xg. Le culot est repris dans 2ml de **tampon NPMD**. La suite des manipulations se déroule à 4°C. Les cellules sont disruptées par sonication 8 fois pendant 15s à 40% d'amplitude (*VibroCell 72408*). La suspension est ensuite centrifugée 2 fois à 12000xg pendant 10 min pour éliminer les débris cellulaires. L'élimination des acides nucléiques se fait par incubation pendant 20 min du surnageant récupéré avec 0,1% de polyéthylèneimine (*Sigma-Aldrich*). Le milieu est ensuite centrifugé 30 min à 12000xg et le surnageant contenant 14 mg de protéines est filtré (*Mini Spin Filters, Bio-Rad*) avant d'être déposé sur colonne Hiprep 16/60 Sephacryl S-200. La colonne a au préalable été équilibrée par de l'eau stérile puis du **tampon TBS**. Le débit d'élution est de 0,5 ml/min et le volume des fractions récoltées de 1ml. Ces dernières sont stockées à -20°C dans 40% de glycérol. Un volume de 0,5 ml de la fraction 54 issue de la gel filtration est prélevé pour être déposé sur colonne Mono-Q. La colonne est équilibrée par du **tampon TBS**. Le débit d'élution est de 0,3ml/min et le volume des fractions récoltées est de 0,3ml. L'élution est réalisée dans un gradient allant de 150mM à 3M de NaCl.

**tampon NPMD** : tampon sodium-phosphate (pH6,5) 20mM ; NaCl 150mM ; MgCl<sub>2</sub> 1mM ; DTT 5mM ; inhibiteurs de protéases : PMSF 0,1mM et cocktail d'inhibiteurs de protéases sans EDTA (*Roche*).

**tampon TBS** : Tris-HCl 50mM pH 8 ; NaCl 150mM

## 4.2 Gel de polyacrylamide protéique

Avant dépôt 10µg de protéines sont mélangées à un volume de **tampon de dépôt protéique** et chauffées à 100°C pendant 10min. Les protéines sont concentrées dans un **gel de concentration** 4% d'acrylamide et séparées dans un **gel de séparation** 12% d'acrylamide. L'électrophorèse est effectuée dans du **tampon Tris-Glycine-SDS** (*EuroMedex*) à 10V/cm. Les protéines sont visualisées par coloration du gel au bleu de coomassie (*Bio-Rad*).

**tampon de dépôt protéique**: 125mM Tris-HCl (pH 6,8), 20% glycerol, 4% SDS, 10% β-mercaptoethanol, 0,004% bleu de bromophénol

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

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

**tampon Tris-Glycine-SDS**: 25mM Tris-HCl, 192mM glycine, 0,1% SDS

**Echelle** : Prestained Protein Ladder (*Fermentas*)

## 4.3 Préparation des échantillons protéiques pour identification par spectrométrie de masse

Après électrophorèse, le gel est rincé puis fixé dans 50% de méthanol et 5% d'acide acétique 100% dans de l'eau pendant 20 min. Le gel est ensuite lavé avec 50% de méthanol dans de l'eau 2 fois 10 min. La sensibilisation du gel est réalisée dans 0,02% de thiosulfate de sodium pendant 1 min suivie d'une coloration au nitrate d'argent à 0,1% pendant 20 min à 4°C. Le gel est de nouveau lavé deux fois dans de l'eau pendant 1 min. Le gel est ensuite développé dans 0,04% de formaline dans 2% de carbonate de sodium. La solution est jetée quand elle devient jaune et remplacée par 5% d'acide acétique dans de l'eau. Le gel est enveloppé dans du plastique et les protéines sont identifiées par spectrométrie de masse MALDI MS et Nano LC-MS/MS à la plateforme protéomique du site de l'esplanade de Strasbourg.

#### 4.4 Isolement des mitochondries humaines pour les tests d'import *in vitro*

Les cellules HepG2 arrivées à confluence dans huit flasques de 225 cm<sup>2</sup> sont récoltées dans du **tampon PBS-EDTA** et centrifugées 10 min à 600xg. Le culot de cellules est ensuite repris dans du tampon MB additionné de 0,3% de BSA. La suite des opérations se déroule à 4°C. Les cellules sont cassées à l'aide d'un broyeur (*Waring Blender*) 3 fois 15 sec et les débris sont éliminés par centrifugation à 600xg pendant 5 min. Le surnageant récupéré est centrifugé 30 min à 20500xg. Le culot de mitochondries ainsi obtenu est repris dans du **tampon MB**. La concentration en protéines mitochondriales est estimée en ajoutant 1 µl de la suspension à 50 µl de NaOH 6% et d'eau stérile pour un volume total de 800 µl. Après ajout de 200 µl de réactif de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*), la DO est lue à 595nm grâce à un spectrophotomètre (*Beckman Coulter*) et la concentration protéique déduite à partir d'une courbe étalon. Les mitochondries sont ensuite aliquotées par 300 µg, congelées dans l'azote liquide et stockées à -80°C.

**tampon MB** : Sorbitol 0,6M; EDTA 1mM; Na-Pipes 10mM p6,7

#### 4.5 Test d'importation dans les mitochondries isolées

Avant leur incubation dans le milieu de réaction les mitochondries de cellules HepG2 sont décongelées à 37°C dans 500 µl de **tampon succinate** préchauffé centrifugées 5min à 13000 rpm à 4°C et le culot (50 µg de mitochondries par test) est repris dans 50 µl de **tampon d'importation**. A ces 50 µl sont ajoutés 3pmol d'ARN marqué au P32 en 5' (environ 20 cps) et les fractions protéiques (10 µg) pour un volume final de 100 µl. Après 10 min d'incubation à 34°C, 100 µl de **RNase 2X** sont ajoutées et laissées à agir 5min à T°C ambiante. Sauf indication, la suite des opérations se déroule à 4°C. Les RNases sont diluées 5X dans la **solution STOP** et le milieu est centrifugé 5min à 12000xg. Trois fois de suite le culot de mitochondries est resuspendu dans 500 µl de tampon MB et centrifugé 5 min à 13000xg pour être lavé. Le culot est ensuite repris dans 100 µl de tampon de lyse et incubé 1min à 100°C avant d'être placé au bain-marie à 50°C. Additionné de 100 µl de phénol saturé par de l'acétate de sodium 0,1M pH5, l'échantillon est vortexé à intervalle de temps régulier pendant 5min puis centrifugé 5 min à 12000g. La phase aqueuse est récupérée et placée à -20°C durant la nuit avec 300 µl d'éthanol, 10 µl d'acétate de sodium 3M et 10 µg d'ARN entraîneur

(ARNt *E. coli*). Après avoir été centrifugé 15min à 12000xg, le culot d'ARN est récupéré et lavé dans 500 µl d'éthanol 80% puis 100%. Le culot est mis à sécher puis dissous dans 10 µl d'eau stérile additionnée de 5 µl du tampon de charge pour être déposé sur gel à 10% PAAG, urée 8M, TBE1X. Après migration à 20mA, le gel est fixé 10 min dans une **solution de fixation** et séché sous vide 1h30 à 75°C. Il est ensuite exposé 24 ou 48h sur Imaging Plate Fuji BASIII. Les signaux radioactifs correspondant à l'ARN protégé sont révélés au Typhoon TRIO (*GE Healthcare*) et quantifiés par le programme ImageQuantTL (*GE Healthcare*).

**tampon succinate** : Tampon MB + Succinate 5mM

**tampon d'importation** : Sorbitol 0,6M ; Hepes KOH 20mM pH 6,7 ; KCl 20mM ; MgCl<sub>2</sub> 2,5mM ; ATP 1mM ; DTT 5mM ; PEP 0,5mM ; pyruvate kinase 10U/mL

**RNase 2X** : MgCl<sub>2</sub> 4mM ; RNase A (*Sigma*) 10ug/mL, préparé dans du tampon MB

**solution STOP** : Tampon MB + EDTA 4mM

**tampon de lyse** : Acétate de sodium 0,1M pH4,8 ; MgCl<sub>2</sub> 10mM ; SDS 1% ; DEPC 0,05%

**solution de fixation** : solution d'acide acétique 10%, ethanol 10%



# **BIBLIOGRAPHIE**



**A**

Alam TI, Kanki T, Muta T, Ukaji K, Abe Y, Nakayama H, Takio K, Hamasaki N, Kang D (2003) Human mitochondrial DNA is packaged with TFAM. *Nucleic acids research* **31**(6): 1640-1645

Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nature genetics* **26**(2): 211-215

Allen JF (1993) Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *Journal of theoretical biology* **165**(4): 609-631

Allikmets R, Raskind WH, Hutchinson A, Schueck ND, Dean M, Koeller DM (1999) Mutation of a putative mitochondrial iron transporter gene (ABC7) in X-linked sideroblastic anemia and ataxia (XLSA/A). *Human molecular genetics* **8**(5): 743-749

Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, de Bruijn MH, Coulson AR, Drouin J, Eperon IC, Nierlich DP, Roe BA, Sanger F, Schreier PH, Smith AJ, Staden R, Young IG (1981) Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* **290**(5806): 457-465

**B**

Bacman SR, Williams SL, Hernandez D, Moraes CT (2007) Modulating mtDNA heteroplasmy by mitochondria-targeted restriction endonucleases in a 'differential multiple cleavage-site' model. *Gene therapy* **14**(18): 1309-1318

Bai Y, Hajek P, Chomyn A, Chan E, Seo BB, Matsuno-Yagi A, Yagi T, Attardi G (2001) Lack of complex I activity in human cells carrying a mutation in MtDNA-encoded ND4 subunit is corrected by the *Saccharomyces cerevisiae* NADH-quinone oxidoreductase (NDI1) gene. *The Journal of biological chemistry* **276**(42): 38808-38813

Baranowska I, Jaderlund KH, Nennesmo I, Holmqvist E, Heidrich N, Larsson NG, Andersson G, Wagner EG, Hedhammar A, Wibom R, Andersson L (2009) Sensory ataxic neuropathy in golden retriever dogs is caused by a deletion in the mitochondrial tRNA<sup>Tyr</sup> gene. *PLoS genetics* **5**(5): e1000499

Barber-Singh J, Seo BB, Nakamaru-Ogiso E, Lau YS, Matsuno-Yagi A, Yagi T (2009) Neuroprotective effect of long-term NDI1 gene expression in a chronic mouse model of Parkinson disorder. *Rejuvenation research* **12**(4): 259-267

Barreau C, Dutertre S, Paillard L, Osborne HB (2006) Liposome-mediated RNA transfection should be used with caution. *RNA* **12**(10): 1790-1793

Bayona-Bafaluy MP, Blits B, Battersby BJ, Shoubridge EA, Moraes CT (2005) Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(40): 14392-14397

- Behlke MA (2008) Chemical modification of siRNAs for in vivo use. *Oligonucleotides* **18**(4): 305-319
- Berendzen K, Theriaque DW, Shuster J, Stacpoole PW (2006) Therapeutic potential of dichloroacetate for pyruvate dehydrogenase complex deficiency. *Mitochondrion* **6**(3): 126-135
- Bhati RS, Sheridan BC, Mill MR, Selzman CH (2005) Heart transplantation for progressive cardiomyopathy as a manifestation of MELAS syndrome. *J Heart Lung Transplant* **24**(12): 2286-2289
- Bingham MJ, Ong TJ, Summer KH, Middleton RB, McArdle HJ (1998) Physiologic function of the Wilson disease gene product, ATP7B. *The American journal of clinical nutrition* **67**(5 Suppl): 982S-987S
- Bione S, D'Adamo P, Maestrini E, Gedeon AK, Bolhuis PA, Toniolo D (1996) A novel X-linked gene, G4.5, is responsible for Barth syndrome. *Nature genetics* **12**(4): 385-389
- Bogenghagen DF, Rousseau D, Burke S (2008) The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *The Journal of biological chemistry* **283**(6): 3665-3675
- Bokori-Brown M, Holt IJ (2006) Expression of algal nuclear ATP synthase subunit 6 in human cells results in protein targeting to mitochondria but no assembly into ATP synthase. *Rejuvenation research* **9**(4): 455-469
- Bonnet C, Augustin S, Ellouze S, Benit P, Bouaita A, Rustin P, Sahel JA, Corral-Debrinski M (2008) The optimized allotopic expression of ND1 or ND4 genes restores respiratory chain complex I activity in fibroblasts harboring mutations in these genes. *Biochimica et biophysica acta* **1783**(10): 1707-1717
- Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, Munnich A, Rotig A (1995) Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nature genetics* **11**(2): 144-149
- Bowmaker M, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Jacobs HT, Huberman JA, Holt IJ (2003) Mammalian mitochondrial DNA replicates bidirectionally from an initiation zone. *The Journal of biological chemistry* **278**(51): 50961-50969
- Brandina I, Graham J, Lemaitre-Guillier C, Entelis N, Krasheninnikov I, Sweetlove L, Tarassov I, Martin RP (2006) Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1757**(9-10): 1217-1228
- Brown TA, Cecconi C, Tkachuk AN, Bustamante C, Clayton DA (2005) Replication of mitochondrial DNA occurs by strand displacement with alternative light-strand origins, not via a strand-coupled mechanism. *Genes & development* **19**(20): 2466-2476
- Burger G, Gray MW, Lang BF (2003) Mitochondrial genomes: anything goes. *Trends Genet* **19**(12): 709-716

## C

- Calvo S, Jain M, Xie X, Sheth SA, Chang B, Goldberger OA, Spinazzola A, Zeviani M, Carr SA, Mootha VK (2006) Systematic identification of human mitochondrial disease genes through integrative genomics. *Nature genetics* **38**(5): 576-582
- Campuzano V, Montermini L, Molto MD, Pianese L, Cossee M, Cavalcanti F, Monros E, Rodius F, Duclos F, Monticelli A, Zara F, Canizares J, Koutnikova H, Bidichandani SI, Gellera C, Brice A, Trouillas P, De Michele G, Filla A, De Frutos R, Palau F, Patel PI, Di Donato S, Mandel JL, Coccozza S, Koenig M, Pandolfo M (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science (New York, NY)* **271**(5254): 1423-1427
- Cao L, Shitara H, Horii T, Nagao Y, Imai H, Abe K, Hara T, Hayashi J, Yonekawa H (2007) The mitochondrial bottleneck occurs without reduction of mtDNA content in female mouse germ cells. *Nature genetics* **39**(3): 386-390
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T, Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**(4): 628-644
- Chang DD, Clayton DA (1985) Priming of human mitochondrial DNA replication occurs at the light-strand promoter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **82**(2): 351-355
- Chang DD, Clayton DA (1987) A mammalian mitochondrial RNA processing activity contains nucleus-encoded RNA. *Science (New York, NY)* **235**(4793): 1178-1184
- Chinnery PF, Taylor RW, Diekert K, Lill R, Turnbull DM, Lightowlers RN (1999) Peptide nucleic acid delivery to human mitochondria. *Gene therapy* **6**(12): 1919-1928
- Claros MG, Perea J, Shu Y, Samatey FA, Popot JL, Jacq C (1995) Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *European journal of biochemistry / FEBS* **228**(3): 762-771
- Cormier V, Rotig A, Quartino AR, Forni GL, Cerone R, Maier M, Saudubray JM, Munnich A (1990) Widespread multi-tissue deletions of the mitochondrial genome in the Pearson marrow-pancreas syndrome. *The Journal of pediatrics* **117**(4): 599-602
- Craven L, Tuppen HA, Greggains GD, Harbottle SJ, Murphy JL, Cree LM, Murdoch AP, Chinnery PF, Taylor RW, Lightowlers RN, Herbert M, Turnbull DM (2010) Pronuclear transfer in human embryos to prevent transmission of mitochondrial DNA disease. *Nature* **465**(7294): 82-85
- Cree LM, Samuels DC, de Sousa Lopes SC, Rajasimha HK, Wonnapijit P, Mann JR, Dahl HH, Chinnery PF (2008) A reduction of mitochondrial DNA molecules during embryogenesis explains the rapid segregation of genotypes. *Nature genetics* **40**(2): 249-254
- Crimi M, Del Bo R, Galbiati S, Sciacco M, Bordoni A, Bresolin N, Comi GP (2003) Mitochondrial A12308G polymorphism affects clinical features in patients with single mtDNA macrodeletion. *Eur J Hum Genet* **11**(11): 896-898

**D**

Dassa EP, Dufour E, Goncalves S, Paupe V, Hakkaart GA, Jacobs HT, Rustin P (2009) Expression of the alternative oxidase complements cytochrome c oxidase deficiency in human cells. *EMBO molecular medicine* **1**(1): 30-36

de Grey AD (2005) Forces maintaining organellar genomes: is any as strong as genetic code disparity or hydrophobicity? *Bioessays* **27**(4): 436-446

de Lonlay P, Valnot I, Barrientos A, Gorbatyuk M, Tzagoloff A, Taanman JW, Benayoun E, Chretien D, Kadhom N, Lombes A, de Baulny HO, Niaudet P, Munnich A, Rustin P, Rotig A (2001) A mutant mitochondrial respiratory chain assembly protein causes complex III deficiency in patients with tubulopathy, encephalopathy and liver failure. *Nature genetics* **29**(1): 57-60

De Luca C, Besagni C, Frontali L, Bolotin-Fukuhara M, Francisci S (2006) Mutations in yeast mt tRNAs: specific and general suppression by nuclear encoded tRNA interactors. *Gene* **377**: 169-176

De Meirleir L, Seneca S, Lissens W, De Clercq I, Eyskens F, Gerlo E, Smet J, Van Coster R (2004) Respiratory chain complex V deficiency due to a mutation in the assembly gene ATP12. *Journal of medical genetics* **41**(2): 120-124

Diaz F, Bayona-Bafaluy MP, Rana M, Mora M, Hao H, Moraes CT (2002) Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. *Nucleic Acids Res* **30**(21): 4626-4633

Doersen CJ, Guerrier-Takada C, Altman S, Attardi G (1985) Characterization of an RNase P activity from HeLa cell mitochondria. Comparison with the cytosol RNase P activity. *The Journal of biological chemistry* **260**(10): 5942-5949

**E**

Elliott HR, Samuels DC, Eden JA, Relton CL, Chinnery PF (2008) Pathogenic mitochondrial DNA mutations are common in the general population. *American journal of human genetics* **83**(2): 254-260

Entelis N, Brandina I, Kamenski P, Krasheninnikov IA, Martin RP, Tarassov I (2006) A glycolytic enzyme, enolase, is recruited as a cofactor of tRNA targeting toward mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genes & development* **20**(12): 1609-1620

Entelis NS, Kieffer S, Kolesnikova OA, Martin RP, Tarassov IA (1998) Structural requirements of tRNA<sup>Lys</sup> for its import into yeast mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(6): 2838-2843

Entelis NS, Kolesnikova OA, Dogan S, Martin RP, Tarassov IA (2001) 5 S rRNA and tRNA import into human mitochondria. Comparison of in vitro requirements. *The Journal of biological chemistry* **276**(49): 45642-45653

**F**

Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM (2007) DNA replication and transcription in mammalian mitochondria. *Annual review of biochemistry* **76**: 679-699

Fan W, Waymire KG, Narula N, Li P, Rocher C, Coskun PE, Vannan MA, Narula J, Macgregor GR, Wallace DC (2008) A mouse model of mitochondrial disease reveals germline selection against severe mtDNA mutations. *Science (New York, NY)* **319**(5865): 958-962

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

Feuermann M, Francisci S, Rinaldi T, De Luca C, Rohou H, Frontali L, 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 reports* **4**(1): 53-58

Finsterer J (2008) Leigh and Leigh-like syndrome in children and adults. *Pediatric neurology* **39**(4): 223-235

Frechin M, Senger B, Braye M, Kern D, Martin RP, Becker HD (2009) Yeast mitochondrial Gln-tRNA(Gln) is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS. *Genes & development* **23**(9): 1119-1130

Fuste JM, Wanrooij S, Jemt E, Granycome CE, Cluett TJ, Shi Y, Atanassova N, Holt IJ, Gustafsson CM, Falkenberg M (2010) Mitochondrial RNA polymerase is needed for activation of the origin of light-strand DNA replication. *Molecular cell* **37**(1): 67-78

**G**

Gaspari M, Falkenberg M, Larsson NG, Gustafsson CM (2004) The mitochondrial RNA polymerase contributes critically to promoter specificity in mammalian cells. *The EMBO journal* **23**(23): 4606-4614

Gilkerson RW, Schon EA (2008) Nucleoid autonomy: An underlying mechanism of mitochondrial genetics with therapeutic potential. *Commun Integr Biol* **1**(1): 34-36

Goffart S, Cooper HM, Tynismaa H, Wanrooij S, Suomalainen A, Spelbrink JN (2009) Twinkle mutations associated with autosomal dominant progressive external ophthalmoplegia lead to impaired helicase function and in vivo mtDNA replication stalling. *Hum Mol Genet* **18**(2): 328-340

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

Guy J, Qi X, Pallotti F, Schon EA, Manfredi G, Carelli V, Martinuzzi A, Hauswirth WW, Lewin AS (2002) Rescue of a mitochondrial deficiency causing Leber Hereditary Optic Neuropathy. *Annals of neurology* **52**(5): 534-542

**H**

He J, Mao CC, Reyes A, Sembongi H, Di Re M, Granycome C, Clippingdale AB, Fearnley IM, Harbour M, Robinson AJ, Reichelt S, Spelbrink JN, Walker JE, Holt IJ (2007) The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization. *The Journal of cell biology* **176**(2): 141-146

Hirano M, DiMauro S (2001) ANTF1, Twinkle, POLG, and TP: new genes open our eyes to ophthalmoplegia. *Neurology* **57**(12): 2163-2165

Holt IJ (2009) Mitochondrial DNA replication and repair: all a flap. *Trends Biochem Sci* **34**(7): 358-365

Holt IJ, Harding AE, Morgan-Hughes JA (1988) Deletions of muscle mitochondrial DNA in patients with mitochondrial myopathies. *Nature* **331**(6158): 717-719

Holt IJ, Lorimer HE, Jacobs HT (2000) Coupled leading- and lagging-strand synthesis of mammalian mitochondrial DNA. *Cell* **100**(5): 515-524

Holzmann J, Frank P, Löffler E, Bennett KL, Gerner C, Rossmannith W (2008) RNase P without RNA: identification and functional reconstitution of the human mitochondrial tRNA processing enzyme. *Cell* **135**(3): 462-474

**I**

Iborra FJ, Kimura H, Cook PR (2004) The functional organization of mitochondrial genomes in human cells. *BMC biology* **2**: 9

Inoue K, Nakada K, Ogura A, Isobe K, Goto Y, Nonaka I, Hayashi JI (2000) Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nature genetics* **26**(2): 176-181

**J**

Jenuth JP, Peterson AC, Shoubridge EA (1997) Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nature genetics* **16**(1): 93-95

**K**

Kaguni LS (2004) DNA polymerase gamma, the mitochondrial replicase. *Annual review of biochemistry* **73**: 293-320

Kamenski P, Kolesnikova O, Jubenot V, Entelis N, Krasheninnikov IA, Martin RP, Tarassov I (2007) Evidence for an adaptation mechanism of mitochondrial translation via tRNA import from the cytosol. *Molecular cell* **26**(5): 625-637

Karkos PD, Anari S, Johnson IJ (2005) Cochlear implantation in patients with MELAS syndrome. *Eur Arch Otorhinolaryngol* **262**(4): 322-324

- Kazakova HA, Entelis NS, Martin RP, Tarassov IA (1999) The aminoacceptor stem of the yeast tRNA(Lys) contains determinants of mitochondrial import selectivity. *FEBS Lett* **442**(2-3): 193-197
- Kibbe WA (2007) OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res* **35**(Web Server issue): W43-46
- Kim I, Rodriguez-Enriquez S, Lemasters JJ (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Archives of biochemistry and biophysics* **462**(2): 245-253
- King MP, Attardi G (1988) Injection of mitochondria into human cells leads to a rapid replacement of the endogenous mitochondrial DNA. *Cell* **52**(6): 811-819
- Kirby DM, Thorburn DR (2008) Approaches to finding the molecular basis of mitochondrial oxidative phosphorylation disorders. *Twin Res Hum Genet* **11**(4): 395-411
- Kiss T, Filipowicz W (1992) Evidence against a mitochondrial location of the 7-2/MRP RNA in mammalian cells. *Cell* **70**(1): 11-16
- Kolesnikova O, Kazakova H, Comte C, Steinberg S, Kamenski P, Martin RP, Tarassov I, Entelis N (2010) Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria. *RNA* **16**(5): 926-941
- Kolesnikova OA, Entelis NS, Jacquin-Becker C, Goltzene F, Chrzanowska-Lightowlers ZM, Lightowlers RN, Martin RP, Tarassov I (2004) Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Human molecular genetics* **13**(20): 2519-2534
- Kolesnikova OA, Entelis NS, Mireau H, Fox TD, Martin RP, Tarassov IA (2000) Suppression of mutations in mitochondrial DNA by tRNAs imported from the cytoplasm. *Science (New York, NY)* **289**(5486): 1931-1933
- Korhonen JA, Gaspari M, Falkenberg M (2003) TWINKLE Has 5' -> 3' DNA helicase activity and is specifically stimulated by mitochondrial single-stranded DNA-binding protein. *The Journal of biological chemistry* **278**(49): 48627-48632
- Korhonen JA, Pham XH, Pellegrini M, Falkenberg M (2004) Reconstitution of a minimal mtDNA replisome in vitro. *The EMBO journal* **23**(12): 2423-2429
- Kreuzer KN (2000) Recombination-dependent DNA replication in phage T4. *Trends in biochemical sciences* **25**(4): 165-173
- Krishnan KJ, Reeve AK, Samuels DC, Chinnery PF, Blackwood JK, Taylor RW, Wanrooij S, Spelbrink JN, Lightowlers RN, Turnbull DM (2008) What causes mitochondrial DNA deletions in human cells? *Nature genetics* **40**(3): 275-279
- Kucharczyk R, Salin B, di Rago JP (2009) Introducing the human Leigh syndrome mutation T9176G into *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial DNA leads to severe defects in the incorporation of Atp6p into the ATP synthase and in the mitochondrial morphology. *Human molecular genetics* **18**(15): 2889-2898

**L**

Lamperti C, Naini A, Hirano M, De Vivo DC, Bertini E, Servidei S, Valeriani M, Lynch D, Banwell B, Berg M, Dubrovsky T, Chiriboga C, Angelini C, Pegoraro E, DiMauro S (2003) Cerebellar ataxia and coenzyme Q10 deficiency. *Neurology* **60**(7): 1206-1208

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

Liu P, Demple B (2010) DNA repair in mammalian mitochondria: Much more than we thought? *Environmental and molecular mutagenesis* **51**(5): 417-426

Lu Q, Wierzbicki S, Krasilnikov AS, Schmitt ME (2010) Comparison of mitochondrial and nucleolar RNase MRP reveals identical RNA components with distinct enzymatic activities and protein components. *RNA (New York, NY)* **16**(3): 529-537

Luft R, Ikkos D, Palmieri G, Ernster L, Afzelius B (1962) A case of severe hypermetabolism of nonthyroid origin with a defect in the maintenance of mitochondrial respiratory control: a correlated clinical, biochemical, and morphological study. *The Journal of clinical investigation* **41**: 1776-1804

**M**

Maceluch JA, Niedziela M (2006) The clinical diagnosis and molecular genetics of kearns-sayre syndrome: a complex mitochondrial encephalomyopathy. *Pediatr Endocrinol Rev* **4**(2): 117-137

Mahata B, Mukherjee S, Mishra S, Bandyopadhyay A, Adhya S (2006) Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells. *Science (New York, NY)* **314**(5798): 471-474

Man PY, Turnbull DM, Chinnery PF (2002) Leber hereditary optic neuropathy. *Journal of medical genetics* **39**(3): 162-169

Manfredi G, Gupta N, Vazquez-Memije ME, Sadlock JE, Spinazzola A, De Vivo DC, Schon EA (1999) Oligomycin induces a decrease in the cellular content of a pathogenic mutation in the human mitochondrial ATPase 6 gene. *The Journal of biological chemistry* **274**(14): 9386-9391

Martens PA, Clayton DA (1979) Mechanism of mitochondrial DNA replication in mouse L-cells: localization and sequence of the light-strand origin of replication. *Journal of molecular biology* **135**(2): 327-351

Martin M, Cho J, Cesare AJ, Griffith JD, Attardi G (2005) Termination factor-mediated DNA loop between termination and initiation sites drives mitochondrial rRNA synthesis. *Cell* **123**(7): 1227-1240

- Minczuk M, Papworth MA, Kolasinska P, Murphy MP, Klug A (2006) Sequence-specific modification of mitochondrial DNA using a chimeric zinc finger methylase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(52): 19689-19694
- Minczuk M, Papworth MA, Miller JC, Murphy MP, Klug A (2008) Development of a single-chain, quasi-dimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucleic acids research* **36**(12): 3926-3938
- Montanari A, Besagni C, De Luca C, Morea V, Oliva R, Tramontano A, Bolotin-Fukuhara M, Frontali L, Francisci S (2008) Yeast as a model of human mitochondrial tRNA base substitutions: investigation of the molecular basis of respiratory defects. *RNA (New York, NY)* **14**(2): 275-283
- Montoya J, Christianson T, Levens D, Rabinowitz M, Attardi G (1982) Identification of initiation sites for heavy-strand and light-strand transcription in human mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**(23): 7195-7199
- Moraes CT, Sciacco M, Ricci E, Tengan CH, Hao H, Bonilla E, Schon EA, DiMauro S (1995) Phenotype-genotype correlations in skeletal muscle of patients with mtDNA deletions. *Muscle & nerve* **3**: S150-153
- Mukherjee S, Basu S, Home P, Dhar G, Adhya S (2007) Necessary and sufficient factors for the import of transfer RNA into the kinetoplast mitochondrion. *EMBO reports* **8**(6): 589-595
- Mukherjee S, Mahata B, Mahato B, Adhya S (2008) Targeted mRNA degradation by complex-mediated delivery of antisense RNAs to intracellular human mitochondria. *Human molecular genetics* **17**(9): 1292-1298
- Muratovska A, Lightowlers RN, Taylor RW, Turnbull DM, Smith RA, Wilce JA, Martin SW, Murphy MP (2001) Targeting peptide nucleic acid (PNA) oligomers to mitochondria within cells by conjugation to lipophilic cations: implications for mitochondrial DNA replication, expression and disease. *Nucleic acids research* **29**(9): 1852-1863
- Murphy JL, Blakely EL, Schaefer AM, He L, Wyrick P, Haller RG, Taylor RW, Turnbull DM, Taivassalo T (2008) Resistance training in patients with single, large-scale deletions of mitochondrial DNA. *Brain* **131**(Pt 11): 2832-2840
- N**
- Nagley P, Farrell LB, Gearing DP, Nero D, Meltzer S, Devenish RJ (1988) Assembly of functional proton-translocating ATPase complex in yeast mitochondria with cytoplasmically synthesized subunit 8, a polypeptide normally encoded within the organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **85**(7): 2091-2095
- Nakada K, Sato A, Sone H, Kasahara A, Ikeda K, Kagawa Y, Yonekawa H, Hayashi J (2004) Accumulation of pathogenic DeltamtDNA induced deafness but not diabetic phenotypes in mito-mice. *Biochemical and biophysical research communications* **323**(1): 175-184

Nakano S, Fujimoto M, Hara H, Sugimoto N (1999) Nucleic acid duplex stability: influence of base composition on cation effects. *Nucleic Acids Res* **27**(14): 2957-2965

Nass S, Nass MM (1963) Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. Ii. Enzymatic and Other Hydrolytic Treatments. *The Journal of cell biology* **19**: 613-629

Nishino I, Spinazzola A, Hirano M (1999) Thymidine phosphorylase gene mutations in MNGIE, a human mitochondrial disorder. *Science (New York, NY)* **283**(5402): 689-692

## O

O'Brien TW, Denslow ND (1996) 13Bovine mitochondrial ribosomes. *Methods Enzymol* **264**: 237-248

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

## P

Park H, Davidson E, King MP (2008) Overexpressed mitochondrial leucyl-tRNA synthetase suppresses the A3243G mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *RNA (New York, NY)* **14**(11): 2407-2416

Park JS, Li YF, Bai Y (2007) Yeast NDI1 improves oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber's hereditary optic neuropathy mutation. *Biochimica et biophysica acta* **1772**(5): 533-542

Poe BG, 3rd, Duffy CF, Greminger MA, Nelson BJ, Arriaga EA (2010) Detection of heteroplasmy in individual mitochondrial particles. *Anal Bioanal Chem* **397**(8): 3397-3407

Pohjoismaki JL, Holmes JB, Wood SR, Yang MY, Yasukawa T, Reyes A, Bailey LJ, Cluett TJ, Goffart S, Willcox S, Rigby RE, Jackson AP, Spelbrink JN, Griffith JD, Crouch RJ, Jacobs HT, Holt IJ (2010) Mammalian mitochondrial DNA replication intermediates are essentially duplex but contain extensive tracts of RNA/DNA hybrid. *J Mol Biol* **397**(5): 1144-1155

Pohjoismaki JL, Wanrooij S, Hyvarinen AK, Goffart S, Holt IJ, Spelbrink JN, Jacobs HT (2006) Alterations to the expression level of mitochondrial transcription factor A, TFAM, modify the mode of mitochondrial DNA replication in cultured human cells. *Nucleic Acids Res* **34**(20): 5815-5828

Puranam RS, Attardi G (2001) The RNase P associated with HeLa cell mitochondria contains an essential RNA component identical in sequence to that of the nuclear RNase P. *Molecular and cellular biology* **21**(2): 548-561

## R

Rinehart J, Krett B, Rubio MA, Alfonzo JD, Soll D (2005) *Saccharomyces cerevisiae* imports the cytosolic pathway for Gln-tRNA synthesis into the mitochondrion. *Genes & development* **19**(5): 583-592

Robberson DL, Clayton DA (1972) Replication of mitochondrial DNA in mouse L cells and their thymidine kinase - derivatives: displacement replication on a covalently-closed circular template. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **69**(12): 3810-3814

Roesch K, Curran SP, Tranebjaerg L, Koehler CM (2002) Human deafness dystonia syndrome is caused by a defect in assembly of the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Human molecular genetics* **11**(5): 477-486

Ross GF, Smith PM, McGregor A, Turnbull DM, Lightowlers RN (2003) Synthesis of trifunctional PNA-benzophenone derivatives for mitochondrial targeting, selective DNA binding, and photo-cross-linking. *Bioconjugate chemistry* **14**(5): 962-966

Rotig A, Poulton J (2009) Genetic causes of mitochondrial DNA depletion in humans. *Biochimica et biophysica acta* **1792**(12): 1103-1108

Rubio MA, Rinehart JJ, Krett B, Duvezin-Caubet S, Reichert AS, Soll D, Alfonzo JD (2008) Mammalian mitochondria have the innate ability to import tRNAs by a mechanism distinct from protein import. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**(27): 9186-9191

## S

Sacconi S, Salviati L, Sue CM, Shanske S, Davidson MM, Bonilla E, Naini AB, De Vivo DC, DiMauro S (2003) Mutation screening in patients with isolated cytochrome c oxidase deficiency. *Pediatric research* **53**(2): 224-230

Sagan L (1967) On the origin of mitosing cells. *Journal of theoretical biology* **14**(3): 255-274

Salinas T, Duchene AM, Delage L, Nilsson S, Glaser E, Zaepfel M, Marechal-Drouard L (2006) The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRNA import machinery in plant mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**(48): 18362-18367

Salinas T, Duchene AM, Marechal-Drouard L (2008) Recent advances in tRNA mitochondrial import. *Trends in biochemical sciences* **33**(7): 320-329

Samuels DC, Schon EA, Chinnery PF (2004) Two direct repeats cause most human mtDNA deletions. *Trends Genet* **20**(9): 393-398

Santra S, Gilkerson RW, Davidson M, Schon EA (2004) Ketogenic treatment reduces deleted mitochondrial DNAs in cultured human cells. *Ann Neurol* **56**(5): 662-669

Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siecle. *Science (New York, NY)* **283**(5407): 1488-1493

Sasarman F, Antonicka H, Shoubridge EA (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

Scarpulla RC (2008) Transcriptional paradigms in mammalian mitochondrial biogenesis and function. *Physiological reviews* **88**(2): 611-638

Schaefer AM, Taylor RW, Turnbull DM, Chinnery PF (2004) The epidemiology of mitochondrial disorders--past, present and future. *Biochimica et biophysica acta* **1659**(2-3): 115-120

Schulz JB, Di Prospero NA, Fischbeck K (2009) Clinical experience with high-dose idebenone in Friedreich ataxia. *Journal of neurology* **256 Suppl 1**: 42-45

Shoffner JM, Lott MT, Lezza AM, Seibel P, Ballinger SW, Wallace DC (1990) Myoclonic epilepsy and ragged-red fiber disease (MERRF) is associated with a mitochondrial DNA tRNA(Lys) mutation. *Cell* **61**(6): 931-937

Shutt TE, Gray MW (2006) Bacteriophage origins of mitochondrial replication and transcription proteins. *Trends Genet* **22**(2): 90-95

Simonsz HJ, Barlocher K, Rotig A (1992) Kearns-Sayre's syndrome developing in a boy who survived pearson's syndrome caused by mitochondrial DNA deletion. *Documenta ophthalmologica* **82**(1-2): 73-79

Smirnov A, Comte C, Mager-Heckel AM, Addis V, Krasheninnikov IA, Martin RP, Entelis N, Tarassov I (2010) Mitochondrial enzyme rhodanese is essential for 5S ribosomal RNA import into human mitochondria. *The Journal of biological chemistry*

Smirnov A, Tarassov I, Mager-Heckel AM, Letzelter M, Martin RP, Krasheninnikov IA, Entelis N (2008) Two distinct structural elements of 5S rRNA are needed for its import into human mitochondria. *RNA (New York, NY)* **14**(4): 749-759

Smith PM, Ross GF, Taylor RW, Turnbull DM, Lightowlers RN (2004) Strategies for treating disorders of the mitochondrial genome. *Biochimica et biophysica acta* **1659**(2-3): 232-239

Spelbrink JN, Li FY, Tiranti V, Nikali K, Yuan QP, Tariq M, Wanrooij S, Garrido N, Comi G, Morandi L, Santoro L, Toscano A, Fabrizi GM, Somer H, Croxen R, Beeson D, Poulton J, Suomalainen A, Jacobs HT, Zeviani M, Larsson C (2001) Human mitochondrial DNA deletions associated with mutations in the gene encoding Twinkle, a phage T7 gene 4-like protein localized in mitochondria. *Nat Genet* **28**(3): 223-231

Srivastava S, Moraes CT (2001) Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Human molecular genetics* **10**(26): 3093-3099

St-Pierre J, Buckingham JA, Roebuck SJ, Brand MD (2002) Topology of superoxide production from different sites in the mitochondrial electron transport chain. *The Journal of biological chemistry* **277**(47): 44784-44790

Sutovsky P, Moreno RD, Ramalho-Santos J, Dominko T, Simerly C, Schatten G (1999) Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* **402**(6760): 371-372

Suyama Y (1967) The origins of mitochondrial ribonucleic acids in *Tetrahymena pyriformis*. *Biochemistry* **6**(9): 2829-2839

Swerdlow RH (2007) Mitochondria in cybrids containing mtDNA from persons with mitochondrialopathies. *J Neurosci Res* **85**(15): 3416-3428

## T

Tachibana M, Sparman M, Sritanandomchai H, Ma H, Clepper L, Woodward J, Li Y, Ramsey C, Kolotushkina O, Mitalipov S (2009) Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature* **461**(7262): 367-372

Tanaka M, Borgeld HJ, Zhang J, Muramatsu S, Gong JS, Yoneda M, Maruyama W, Naoi M, Ibi T, Sahashi K, Shamoto M, Fuku N, Kurata M, Yamada Y, Nishizawa K, Akao Y, Ohishi N, Miyabayashi S, Umemoto H, Muramatsu T, Furukawa K, Kikuchi A, Nakano I, Ozawa K, Yagi K (2002) Gene therapy for mitochondrial disease by delivering restriction endonuclease SmaI into mitochondria. *Journal of biomedical science* **9**(6 Pt 1): 534-541

Tarassov I, Entelis N, Martin RP (1995) An intact protein translocating machinery is required for mitochondrial import of a yeast cytoplasmic tRNA. *Journal of molecular biology* **245**(4): 315-323

Tatuch Y, Christodoulou J, Feigenbaum A, Clarke JT, Wherret J, Smith C, Rudd N, Petrova-Benedict R, Robinson BH (1992) Heteroplasmic mtDNA mutation (T----G) at 8993 can cause Leigh disease when the percentage of abnormal mtDNA is high. *American journal of human genetics* **50**(4): 852-858

Taylor RW, Chinnery PF, Turnbull DM, Lightowlers RN (1997) Selective inhibition of mutant human mitochondrial DNA replication in vitro by peptide nucleic acids. *Nat Genet* **15**(2): 212-215

Tiranti V, Hoertnagel K, Carozzo R, Galimberti C, Munaro M, Granatiero M, Zelante L, Gasparini P, Marzella R, Rocchi M, Bayona-Bafaluy MP, Enriquez JA, Uziel G, Bertini E, Dionisi-Vici C, Franco B, Meitinger T, Zeviani M (1998) Mutations of SURF-1 in Leigh disease associated with cytochrome c oxidase deficiency. *American journal of human genetics* **63**(6): 1609-1621

Triepels RH, Van Den Heuvel LP, Trijbels JM, Smeitink JA (2001) Respiratory chain complex I deficiency. *American journal of medical genetics* **106**(1): 37-45

Tyynismaa H, Mjosund KP, Wanrooij S, Lappalainen I, Ylikallio E, Jalanko A, Spelbrink JN, Paetau A, Suomalainen A (2005) Mutant mitochondrial helicase Twinkle causes multiple mtDNA deletions and a late-onset mitochondrial disease in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(49): 17687-17692

Tyynismaa H, Suomalainen A (2009) Mouse models of mitochondrial DNA defects and their relevance for human disease. *EMBO reports* **10**(2): 137-143

## V

Vaishnav AK, Gollob J, Gamba-Vitalo C, Hutabarat R, Sah D, Meyers R, de Fougères T, Maraganore J (2010) A status report on RNAi therapeutics. *Silence* **1**(1): 14

## W

Wai T, Teoli D, Shoubridge EA (2008) The mitochondrial DNA genetic bottleneck results from replication of a subpopulation of genomes. *Nature genetics* **40**(12): 1484-1488

Wallace DC (2005) The mitochondrial genome in human adaptive radiation and disease: on the road to therapeutics and performance enhancement. *Gene* **354**: 169-180

Wang G, Chen HW, Oktay Y, Zhang J, Allen EL, Smith GM, Fan KC, Hong JS, French SW, McCaffery JM, Lightowers RN, Morse HC, 3rd, Koehler CM, Teitell MA (2010) PNPASE regulates RNA import into mitochondria. *Cell* **142**(3): 456-467

Wang G, Chen HW, Oktay Y, Zhang J, Allen EL, Smith GM, Fan KC, Hong JS, French SW, McCaffery JM, Lightowers RN, Morse HC, 3rd, Koehler CM, Teitell MA (2010) PNPASE Regulates RNA Import into Mitochondria. *Cell* **142**(3): 456-467

Wang G, Xu XS (2004) Peptide nucleic acid (PNA) binding-mediated gene regulation. *Cell Res* **14**(2): 111-116

Wanrooij S, Fuste JM, Farge G, Shi Y, Gustafsson CM, Falkenberg M (2008) Human mitochondrial RNA polymerase primes lagging-strand DNA synthesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(32): 11122-11127

Wanrooij S, Goffart S, Pohjoismaki JL, Yasukawa T, Spelbrink JN (2007) Expression of catalytic mutants of the mtDNA helicase Twinkle and polymerase POLG causes distinct replication stalling phenotypes. *Nucleic Acids Res* **35**(10): 3238-3251

Wenz T, Diaz F, Spiegelman BM, Moraes CT (2008) Activation of the PPAR/PGC-1 $\alpha$  pathway prevents a bioenergetic deficit and effectively improves a mitochondrial myopathy phenotype. *Cell metabolism* **8**(3): 249-256

Wittenhagen LM, Kelley SO (2003) Impact of disease-related mitochondrial mutations on tRNA structure and function. *Trends in biochemical sciences* **28**(11): 605-611

Wong TW, Clayton DA (1985) Isolation and characterization of a DNA primase from human mitochondria. *J Biol Chem* **260**(21): 11530-11535

## Y

Yakes FM, Van Houten B (1997) Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**(2): 514-519

Yasukawa T, Reyes A, Cluett TJ, Yang MY, Bowmaker M, Jacobs HT, Holt IJ (2006) Replication of vertebrate mitochondrial DNA entails transient ribonucleotide incorporation throughout the lagging strand. *The EMBO journal* **25**(22): 5358-5371

Yasukawa T, Yang MY, Jacobs HT, Holt IJ (2005) A bidirectional origin of replication maps to the major noncoding region of human mitochondrial DNA. *Mol Cell* **18**(6): 651-662

## **Z**

Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM, Vance JM (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nature genetics* **36**(5): 449-451



## **RESUME DE LA THESE**



## Contexte scientifique

Les mutations dans l'ADN mitochondrial (ADNmt) sont la cause de nombreuses pathologies, pour la plupart des myopathies et des maladies neurodégénératives. La majorité de ces mutations sont hétéroplasmiques, signifiant que les molécules d'ADNmt muté coexistent au sein de la même cellule avec des molécules d'ADNmt sauvage. Ce n'est cependant en général qu'à partir d'un seuil d'hétéroplasmie de l'ordre de 60 à 80% que les symptômes de la maladie apparaissent. En l'absence de traitement efficace pour soigner ce type de pathologies, une piste de thérapie génique consistant à diminuer la quantité d'ADNmt muté au profit de la propagation de l'ADNmt sauvage a été envisagée. En effet, une diminution, même de quelques pour cent du taux d'hétéroplasmie, pourrait théoriquement se révéler suffisante pour stopper ou retarder l'avancement de la maladie. Pour diminuer le niveau d'ADNmt muté dans la cellule, deux approches dites anti-génomiques ont été reportées dans la littérature : dégrader spécifiquement l'ADNmt muté ou inhiber sa réplication. La première stratégie a été testée avec succès *in vivo* en important dans la mitochondrie des enzymes de restriction créant une coupure double brin dans l'ADNmt au niveau d'un site de restriction unique créé par la mutation. La seconde stratégie a quant à elle été testée dans un système de réplication *in vitro* en présence de PNA (Peptide Nucleic Acid) capables de s'hybrider spécifiquement à des brins d'ADNmt muté pour bloquer l'avancement de la polymérase mitochondriale. Malheureusement, cette stratégie s'est heurtée à la difficulté d'adresser *in vivo* de tels oligonucléotides artificiels dans la mitochondrie car l'importation de macromolécules depuis le cytoplasme y est gouvernée par des mécanismes hautement sélectifs et sophistiqués.

## Objectifs

Dans le cadre de ce projet, nous proposons d'acheminer ces oligonucléotides au potentiel anti-répliatif par le biais de vecteurs construits sur la base d'ARN importés dans les mitochondries humaines. Les travaux antérieurs réalisés au laboratoire, effectués chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* (import de l'ARNt<sup>Lys</sup>) et les cellules humaines (import de l'ARNr 5S) ont démontré une flexibilité remarquable de cette voie d'import. En effet, les résultats récemment obtenus au laboratoire ont permis de montrer qu'il était possible d'importer artificiellement l'ARNt<sup>Lys</sup> de levure dans les mitochondries humaines pour y compléter une mutation dans le gène de l'ARNt<sup>Lys</sup> mitochondrial. En tentant d'élucider les déterminants d'importation dans la structure de l'ARNt<sup>Lys</sup> de levure par mutagenèse dirigée et des expériences de sélection *in vitro* (Selex), de petits ARN ne ressemblant plus à l'ARNt de départ ont été sélectionnés. L'analyse de la structure de ces ARN a permis d'observer que la plupart avaient conservé le bras D de l'ARNt<sup>Lys</sup> ainsi qu'une hélice alternative F composée de la partie 3' du bras isoaccepteur de l'ARNt et d'une partie du bras T. La fusion de ces deux hélices a permis de construire un petit ARN importé dans les mitochondries isolées de levures avec une efficacité accrue par rapport à l'ARNt<sup>Lys</sup> de départ. C'est ce petit ARN artificiel, dénommé F1D1, qui a été à la base de mon travail. Les objectifs de cette thèse ont été double. Sur un plan fondamental, ils ont consisté à tester si cet ARN pouvait servir de vecteur pour importer dans les mitochondries humaines des oligonucléotides au potentiel anti-répliatif. Sur un plan appliqué, ils ont consisté à tester si ces ARN recombinants étaient capables d'inhiber la réplication des molécules d'ADNmt muté au profit des génomes sauvages dans un modèle de cellules humaines en culture.

## Résultats

Dans un premier temps l'import de l'ARN F1D1 a été testé *in vitro* dans des mitochondries humaines isolées mais également *in vivo* dans des cellules humaines en culture. Ces études ont permis de démontrer que cet ARN était non seulement importable dans les mitochondries humaines mais avec une efficacité d'import de 5 fois supérieure à celle de l'ARN<sup>Lys</sup> de levure. Ces études ont de plus permis de déterminer que cet import nécessitait la présence de facteurs protéiques solubles.

Une fois l'import de l'ARN F1D1 caractérisé, des oligonucléotides au potentiel anti-répliatif ont été insérés dans sa structure. Notre modèle d'étude repose sur une délétion de l'ADNmt d'environ 7kbp située entre le gène du cytochrome b et celui de l'ARN<sup>Lys</sup> et associée au syndrome de Kearns-Sayre. Des séquences de tailles variables correspondant aux bornes de la délétion et complémentaires au brin H ou au brin L de l'ADNmt ont été insérées entre les hélices D et F de l'ARN F1D1. La structure secondaire de ces ARN recombinants a ensuite été modélisée par le logiciel Mfold de telle façon que les hélices D et F soient maintenues, que les séquences s'hybridant à l'ADNmt muté soit simple brin et qu'aucune structure alternative ne soit prédite. Ces ARN recombinants ont tout d'abord été testés pour leur capacité à être importés *in vitro* dans des mitochondries humaines isolées en présence d'extraits protéiques humains partiellement purifiés. Les inserts anti-répliatifs n'inhibant pas l'import, cette étape a permis de démontrer que l'ARN F1D1 pouvait servir de vecteur d'importation. Les versions importables ont ensuite été testées pour leur capacité à discriminer l'ADNmt délété de l'ADNmt sauvage dans des conditions pseudo-physiologiques par hybridation sur Southern, permettant de sélectionner les versions avec des inserts compris entre 15 et 22 bases. Parallèlement, un système de réplication *in vitro* a été reconstitué et a permis de démontrer qu'en présence des ARN recombinants la réplication de l'ADNmt délété était spécifiquement inhibée et ce de façon dose dépendante.

La faisabilité du projet ayant été démontrée *in vitro*, les ARN recombinants sélectionnés par le crible des expériences décrites ci-dessus ont ensuite été testés pour leur capacité à engendrer un changement du niveau d'hétéroplasmie dans des cellules cybrides. Les cellules cybrides sont des cellules immortalisées contenant les mitochondries du patient. Le nombre de copies d'ADNmt délété par rapport au taux d'ADNmt sauvage a été évalué de façon absolue par PCR quantitative en temps réel, permettant de mettre en évidence un taux d'hétéroplasmie de 65% +/- 5%. Les cellules ont donc été tout d'abord transfectées de façon transitoire par lipofection avec les ARN recombinants. Leur importation dans les mitochondries a été vérifiée ainsi que leur stabilité. De façon surprenante les ARN se sont révélés être détectables dans les cellules jusqu'à 5 jours après la transfection. Pour évaluer leur effet sur le taux d'hétéroplasmie, des qPCR ont été effectuées sur des échantillons d'ADN totaux isolés à partir de cellules récupérées chaque jour après leur transfection sur une période de deux semaines. Aucune variation du taux d'hétéroplasmie n'a été observée lorsque les cellules ont été transfectées par des ARN ne contenant pas l'insert anti-répliatif. Par contre, les ARN recombinants se sont révélés capables d'induire une baisse transitoire du taux d'ADNmt muté entre le 4<sup>e</sup> et le 8<sup>e</sup> jour après la transfection avec une baisse maximum d'environ 20% le 6<sup>e</sup> jour. Ces résultats ont été obtenus en transfectant les cellules avec soit les ARN s'hybridant au brin H de l'ADNmt délété soit au brin L.

Des expériences ont ensuite été réalisées en transfectant les cellules avec les deux types d'ARN à la fois, ce qui a permis d'obtenir une baisse d'hétéroplasmie plus prononcée de l'ordre de 35%, 4 jours après la transfection avec un retour au niveau initial le 8<sup>e</sup> jour. Dans l'optique d'une thérapie efficace à proposer au patient, il est toutefois important de pouvoir stabiliser cet effet. Pour ce faire l'expérience décrite précédemment a été poursuivie en retransfectant les cellules le jour où le taux d'ADNmt muté était le plus bas, soit le 4<sup>e</sup> jour

après la première transfection. Des résultats préliminaires ont permis de montrer qu'il était possible de stabiliser le taux d'ADNmt muté pendant au moins 4 jours par la présence d'une concentration constante d'ARN dans les cellules. Des transfactions stables ont donc été réalisées avec un vecteur contenant le gène des ARN recombinants sous le contrôle du promoteur de la polymérase III afin que l'expression des ARN perdure dans les cellules. Malheureusement, aucune expression des ARN n'a pu être observée à ce jour. Une seconde stratégie testée a consisté à introduire des bases modifiées dans l'insert anti-répliatif afin d'augmenter sa stabilité dans les cellules et de stabiliser l'hybride ARN/ADNmt. Trois types de modifications ont été testées : l'ajout de groupements méthylés ou fluors en 2'OH du ribose des bases pyrimidiques ou la conversion des bases de l'insert ARN en ADN. Toutefois, malgré que ces ARN modifiés se soient révélés importables dans les mitochondries, aient une stabilité accrue par rapport aux ARN non modifiés et soient capables de discriminer l'ADNmt muté de l'ADNmt sauvage par hybridation sur Southern, seul l'ARN composé d'un insert en ADN a permis de diminuer le taux d'hétéroplasmie d'un taux de 20% 4 jours après la transfection.

Au final, les résultats les plus prometteurs ont donc été obtenus par la transfection simultanée des ARN s'hybridant à la fois au brin H et au brin L de l'ADNmt muté.

## **Conclusion et perspectives**

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis de montrer qu'il était possible d'utiliser la voie d'import des ARN dans les mitochondries humaines pour y adresser des oligonucléotides complémentaires à l'ADNmt muté et capables d'engendrer une baisse du taux d'hétéroplasmie dans un système de cellules en culture.

Les perspectives de ce travail consisteront d'une part sur un plan fondamental à caractériser les facteurs d'import protéiques impliqués dans l'import des ARN artificiels et d'autre part à caractériser le mécanisme moléculaire qui sous-tend à la baisse du taux d'hétéroplasmie. Sur un plan appliqué, une fois le moyen de stabiliser la baisse d'hétéroplasmie identifié, il faudra tester si cette baisse sera suffisante pour permettre de restaurer les fonctions mitochondriales affectées.

## Liste des publications et des communications

### Publications

**Mitochondrial import of recombinant RNAs modulates the level of a heteroplasmic pathogenic mutation in human mitochondrial DNA.** Caroline Comte, Anne-Marie Heckel-Mager, Abdeljalil Boucheham, Alexandre Smirnov, Anne Lombès, Robert P. Martin, Nina Entelis, Ivan Tarassov (en cours de soumission)

**Mitochondrial enzyme rhodanese is essential for 5S ribosomal RNA import into human mitochondria.** Smirnov A, Comte C, Mager-Heckel AM, Addis V, Krasheninnikov IA, Martin RP, Entelis N, Tarassov I. J Biol Chem. 2010 Jul 27.

**Selection of RNA aptamers imported into yeast and human mitochondria.** Kolesnikova O, Kazakova H, Comte C, Steinberg S, Kamenski P, Martin RP, Tarassov I, Entelis N. RNA. 2010 May;16(5):926-41.

### Communications

**Identification of rhodanèse as a factor of 5S rRNA mitochondrial import.** Comte C, Smirnov A, Mager-Heckel AM, Addis V, Krasheninnikov IA, Martin RP, Entelis N, Tarassov I 1<sup>er</sup> colloque MitoStrass à Strasbourg (France) Avril 2008

**Identification of rhodanèse as a factor of 5S rRNA mitochondrial import.** Comte C, Smirnov A, Mager-Heckel AM, Addis V, Krasheninnikov IA, Martin RP, Entelis N, Tarassov I 2<sup>e</sup> colloque MeetOchondrie à Aussois (France) 21-24 Mai 2008

**Mitochondrial diseases: modeling anti-genomic therapy by imported tRNAs** C. Comte, A.-M. Heckel, R. Martin, A. Lombès, A. Smirnov, I. Tarassov, N. Entelis 3<sup>e</sup> Colloque MeetOchondrie à La Grande Motte (France) 4-7 Mai 2009

**Mitochondrial diseases: modeling anti-genomic therapy by imported tRNAs** C. Comte, A.-M. Heckel, R. Martin, A. Lombès, A. Smirnov, I. Tarassov, N. Entelis 23<sup>rd</sup> tRNA workshop à Aveiro (Portugal), 28janvier -2 février 2010

**Mise au point d'une approche anti-génomique pour des maladies mitochondriales** C. Comte, A.-M. Heckel, R. Martin, A. Lombès, A. Smirnov, I. Tarassov, N. Entelis 2<sup>e</sup> colloque MitoStrass à Strasbourg (France), 29 avril 2010

**Mitochondrial diseases: modeling anti-genomic therapy by imported yeast tRNAs** C. Comte, A.-M. Heckel, R. Martin, A. Lombès, A. Smirnov, I. Tarassov, N. Entelis 9<sup>e</sup> colloque LMO à Strasbourg (France), 30 août -2 septembre 2010

