



HAL
open science

Single-fiber studies for assigning pathogenicity of eight unclassified mitochondrial DNA variants associated with mitochondrial cytopathies phenotypes

Elamine Zereg

► To cite this version:

Elamine Zereg. Single-fiber studies for assigning pathogenicity of eight unclassified mitochondrial DNA variants associated with mitochondrial cytopathies phenotypes. Médecine humaine et pathologie. 2019. dumas-02987196

HAL Id: dumas-02987196

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02987196v1>

Submitted on 3 Nov 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université de Nice Sophia-Antipolis

Faculté de Médecine de Nice

THÈSE D'EXERCICE DE MÉDECINE

**Single-fiber studies for assigning pathogenicity of eight
unclassified mitochondrial DNA variants associated with
mitochondrial cytopathies phenotypes**

Présentée et soutenue publiquement à la Faculté de Médecine de Nice le 07 Octobre 2019

En vue d'obtenir le titre de Docteur en médecine (Diplôme d'Etat)

Par **ELAMINE ZEREG** Né le 12 Août 1985 à Alger

Devant la commission d'examen composée de :

Madame le Professeur Véronique PAQUIS-FLUCKLINGER, Présidente du Jury

Madame le Professeur Sabrina SACCONI, Assesseur

Madame le Professeur Sylvie BANNWARTH, Assesseur

Madame le Docteur Annabelle CHAUSSENOT, Assesseur

Madame le Docteur Cécile ROUZIER, Directrice de Thèse

SERMENT D'HIPPOCRATE

Au moment d'être admis à exercer la médecine, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J'interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l'humanité.

J'informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences. Je ne tromperai jamais leur confiance et n'exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences. Je donnerai mes soins à l'indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis dans l'intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu à l'intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l'indépendance nécessaire à l'accomplissement de ma mission. Je n'entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J'apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu'à leurs familles dans l'adversité. Que les hommes et mes confrères m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses ; que je sois déshonoré et méprisé si j'y manque.

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

Doyen

Pr. BAQUÉ Patrick

Vice-doyens

Pédagogie

Pr. ALUNNI Véronique

Recherche

Pr DELLAMONICA jean

Etudiants

M. JOUAN Robin

Chargé de mission projet Campus

Pr. PAQUIS Philippe

Conservateur de la bibliothèque

Mme AMSELLE Danièle

Directrice administrative des services

Mme CALLEA Isabelle

Doyens Honoraires

M. RAMPAL Patrick

M. BENCHIMOL Daniel

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEURS CLASSE EXCEPTIONNELLE

M.	BAQUÉ Patrick	Anatomie - Chirurgie Générale (42.01)
M.	BERNARDIN Gilles	Réanimation Médicale (48.02)
M.	BOILEAU Pascal	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)
M.	DARCOURT Jacques	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
M.	ESNAULT Vincent	Néphrologie (52-03)
M.	FUZIBET Jean-Gabriel	Médecine Interne (53.01)
M.	GILSON Éric	Biologie Cellulaire (44.03)
M.	GUGENHEIM Jean	Chirurgie Digestive (52.02)
M.	HASSEN KHODJA Reda	Chirurgie Vasculaire (51.04)
M.	HÉBUTERNE Xavier	Nutrition (44.04)
M.	HOFMAN Paul	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
Mme	ICHAÏ Carole	Anesthésiologie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	LACOUR Jean-Philippe	Dermato-Vénérologie (50.03)
M.	LEFTHERIOTIS Geogres	Chirurgie vasculaire ; médecine vasculaire (51.04)
M.	MARQUETTE Charles-Hugo	Pneumologie (51.01)
M.	MARTY Pierre	Parasitologie et Mycologie (45.02)
M.	MICHIELS Jean-François	Anatomie et Cytologie Pathologiques (42.03)
M.	MOUROUX Jérôme	Chirurgie Thoracique et Cardiovasculaire (51.03)
Mme	PAQUIS Véronique	Génétique (47.04)
M.	PAQUIS Philippe	Neurochirurgie (49.02)
M.	QUATREHOMME Gérald	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	RAUCOULES-AIMÉ Marc	Anesthésie et Réanimation Chirurgicale (48.01)
M.	ROBERT Philippe	Psychiatrie d'Adultes (49.03)
M.	THYSS Antoine	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	TRAN Albert	Hépatogastro-entérologie (52.01)

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEURS PREMIERE CLASSE

Mme	ASKENAZY-GITTARD Florence	Pédopsychiatrie (49.04)
M.	BARRANGER Emmanuel	Gynécologie Obstétrique (54.03)
M.	BÉRARD Étienne	Pédiatrie (54.01)
Mme	BLANC-PEDEUTOUR Florence	Cancérologie – Génétique (47.02)
M.	BONGAIN André	Gynécologie-Obstétrique (54.03)
Mme	BREUIL Véronique	Rhumatologie (50.01)
M.	CASTILLO Laurent	O.R.L. (55.01)
M.	CHEVALLIER Patrick	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	DE PERETTI Fernand	Anatomie-Chirurgie Orthopédique (42.01)
M.	DRICI Milou-Daniel	Pharmacologie Clinique (48.03)
M.	FERRARI Émile	Cardiologie (51.02)
M.	FERRERO Jean-Marc	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	FONTAINE Denys	Neurochirurgie (49.02)
M.	GIBELIN Pierre	Cardiologie (51.02)
M.	HANNOUN-LEVI Jean-Michel	Cancérologie ; Radiothérapie (47.02)
M.	LEVRAUT Jacques	Médecine d'urgence (48.05)
M.	LONJON Michel	Neurochirurgie (49.02)
M.	MOUNIER Nicolas	Cancérologie, Radiothérapie (47.02)
M.	PADOVANI Bernard	Radiologie et Imagerie Médicale (43.02)
M.	PICHE Thierry	Gastro-entérologie (52.01)
M.	PRADIER Christian	Épidémiologie, Économie de la Santé et Prévention (46.01)
Mme	RAYNAUD Dominique	Hématologie (47.01)
M.	ROSENTHAL Éric	Médecine Interne (53.01)
M.	SCHNEIDER Stéphane	Nutrition (44.04)
M.	STACCINI Pascal	Biostatistiques et Informatique Médicale (46.04)
M.	THOMAS Pierre	Neurologie (49.01)
M.	TROJANI Christophe	Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (50.02)

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

PROFESSEURS DEUXIEME CLASSE

Mme	ALUNNI Véronique	Médecine Légale et Droit de la Santé (46.03)
M.	ANTY Rodolphe	Gastro-entérologie (52.01)
M.	BAHADORAN Philippe	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	BAILLIF Stéphanie	Ophthalmologie (55.02)
Mme	BANNWARTH Sylvie	Génétique (47.04)
M.	BENZIRI Emmanuel	Chirurgie Générale (53.02)
M.	BENOIT Michel	Psychiatrie (49.03)
M.	BERTHET Jean-Philippe	Chirurgie Thoracique (51-03)
M.	BOZEC Alexandre	ORL- Cancérologie (47.02)
M.	BREAUD Jean	Chirurgie Infantile (54-02)
Mme	BUREL-VANDENBOS Fanny	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	CHEVALIER Nicolas	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
Mme	CHINETTI Giulia	Biochimie-Biologie Moléculaire (44.01)
M.	CLUZEAU Thomas	Hématologie (47.01)
M.	DELLAMONICA Jean	réanimation médicale (48.02)
M.	DELOTTE Jérôme	Gynécologie-obstétrique (54.03)
M	FAVRE Guillaume	Néphrologie (44-02)
M.	FOURNIER Jean-Paul	Thérapeutique (48-04)
Mlle	GIORDANENGO Valérie	Bactériologie-Virologie (45.01)
Mme	GIOVANNINI-CHAMI Lisa	Pédiatrie (54.01)
M.	GUÉRIN Olivier	Méd. In ; Gériatrie (53.01)
M.	IANNELLI Antonio	Chirurgie Digestive (52.02)
M.	ILIE Marius	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M	JEAN BAPTISTE Elixène	Chirurgie vasculaire (51.04)
M.	PASSERON Thierry	Dermato-Vénérologie (50-03)
M.	ROHRLICH Pierre	Pédiatrie (54.01)
M.	ROUX Christian	rhumatologie (50.01)
M.	RUIMY Raymond	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme	SACCONI Sabrina	Neurologie (49.01)
M.	SADOUL Jean-Louis	Endocrinologie, Diabète et Maladies Métaboliques (54.04)
M.	VANBIERVLIET Geoffroy	Gastro-entérologie (52.01)

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS

M.	AMBROSETTI Damien	Cytologie et Histologie (42.02)
M.	BENOLIEL José	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme	BERNARD-POMIER Ghislaine	Immunologie (47.03)
M.	BRONSARD Nicolas	Anatomie Chirurgie Orthopédique et Traumatologique (42.01)
M.	CAMUZARD Olivier	Chirurgie Plastique (50-04)
Mme	CONTENTI-LIPRANDI Julie	Médecine d'urgence (48-04)
M.	DOGLIO Alain	Bactériologie-Virologie (45.01)
M	DOYEN Jérôme	Radiothérapie (47.02)
M.	FOSSE Thierry	Bactériologie-Virologie-Hygiène (45.01)
M.	GARRAFFO Rodolphe	Pharmacologie Fondamentale (48.03)
Mme	HINAULT Charlotte	Biochimie et biologie moléculaire (44.01)
M.	HUMBERT Olivier	Biophysique et Médecine Nucléaire (43.01)
Mme	LAMY Brigitte	Bactériologie-virologie (45.01)
Mme	LONG-MIRA Elodie	Cytologie et Histologie (42.02)
Mme	MAGNIÉ Marie-Noëlle	Physiologie (44.02)
M.	MASSALOU Damien	Chirurgie Viscérale (52-04)
Mme	MOCERI Pamela	Cardiologie (51.02)
M.	MONTAUDIE Henri	Dermatologie (50.03)
Mme	MUSSO-LASSALLE Sandra	Anatomie et Cytologie pathologiques (42.03)
M.	NAÏMI Mourad	Biochimie et Biologie moléculaire (44.01)
Mme	POMARES Christelle	Parasitologie et mycologie (45.02)
M.	SAVOLDELLI Charles	Chirurgie maxillo-faciale et stomatologie (55.03)
Mme	SEITZ-POLSKI barbara	Immunologie (47.03)
M.	SQUARA Fabien	Cardiologie (51.02)
M.	TESTA Jean	Épidémiologie Économie de la Santé et Prévention (46.01)
Mme	THUMMLER Susanne	Pédopsychiatrie (49-04)
M.	TOULON Pierre	Hématologie et Transfusion (47.01)

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

MAITRE DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS

M.	DARMON David	Médecine Générale (53.03)
Mme	GROS Auriane	Orthophonie (69)

PROFESSEURS AGRÉGÉS

Mme	LANDI Rebecca	Anglais
-----	---------------	---------

PRATICIEN HOSPITALIER UNIVERSITAIRE

M.	DURAND Matthieu	Urologie (52.04)
M.	SICARD Antoine	Néphrologie (52-03)

PROFESSEURS ASSOCIÉS

M.	GARDON Gilles	Médecine Générale (53.03)
Mme	MONNIER Brigitte	Médecine Générale (53.03)

MAITRES DE CONFÉRENCES ASSOCIÉS

Mme	CASTA Céline	Médecine Générale (53.03)
M.	GASPERINI Fabrice	Médecine Générale (53.03)
M.	HOGU Nicolas	Médecine Générale (53.03)

Liste des enseignants au 1er septembre 2019 à la Faculté de Médecine de Nice

Constitution du jury en qualité de 4ème membre

Professeurs Honoraires

M. AMIEL Jean	M. FREYCHET Pierre
M ALBERTINI Marc	M. GASTAUD Pierre
M. BALAS Daniel	M. GÉRARD Jean-Pierre
M. BATT Michel	M. GILLET Jean-Yves
M. BLAIVE Bruno	M. GRELLIER Patrick
M. BOQUET Patrice	M. GRIMAUD Dominique
M. BOURGEON André	M. JOURDAN Jacques
M. BOUTTÉ Patrick	M. LAMBERT Jean-Claude
M. BRUNETON Jean-Noël	M. LAZDUNSKI Michel
Mme BUSSIERE Françoise	M. LEFEBVRE Jean-Claude
M. CAMOUS Jean-Pierre	M. LE FICHOUX Yves
M. CANIVET Bertrand	Mme LEBRETON Elisabeth
M. CASSUTO Jill-patrice	M. MARIANI Roger
M. CHATEL Marcel	M. MASSEYEFF René
M. COUSSEMENT Alain	M. MATTEI Mathieu
Mme CRENESSE Dominique	M. MOUIEL Jean
M. DAR COURT Guy	Mme MYQUEL Martine
M. DELLAMONICA Pierre	M. ORTONNE Jean-Paul
M. DELMONT Jean	M. PRINGUEY Dominique
M. DEMARD François	M. SANTINI Joseph
M. DESNUELLE Claude	M. SAUTRON Jean Baptiste
M. DOLISI Claude	M. SCHNEIDER Maurice
Mme EULLER-ZIEGLER Liana	M. TOUBOL Jacques
M. FENICHEL Patrick	M. TRAN Dinh Khiem
M . FRANCO Alain	M VAN OBBERGHEN Emmanuel
	M. ZIEGLER Gérard

M.C.U. Honoraires

M. ARNOLD Jacques	M. GIUDICELLI Jean
M. BASTERIS Bernard	M. MAGNÉ Jacques
M. BENOLIEL José	Mme MEMRAN Nadine
Mlle CHICHMANIAN Rose-Marie	M. MENGUAL Raymond
Mme DONZEAU Michèle	M. PHILIP Patrick
M. EMILIOZZI Roméo	M. POIRÉE Jean-Claude
M. FRANKEN Philippe	Mme ROURE Marie-Claire
M. GASTAUD Marcel	

REMERCIEMENTS

Je remercie Madame le Professeur **Véronique PAQUIS-FLUCKLINGER** d'avoir accepté de présider ce jury. Merci également pour l'enseignement que vous m'avez apporté pendant mon stage au sein de votre service, ainsi qu'au cours du DIU maladies mitochondriales. Soyez assurée de mon profond respect.

Je remercie Madame le Professeur **Sabrina SACCONI** d'avoir accepté de juger mon travail. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde considération.

Je remercie Madame le Professeur **Sylvie BANNWARTH** d'avoir accepté de juger mon travail. Tu me fais honneur d'être membre de mon jury de thèse.

Je remercie Madame le Docteur **Annabelle CHAUSSENOT** d'avoir accepté de juger mon travail. Soit assurée de ma profonde gratitude.

Je remercie Madame le **Docteur Cécile ROUZIER** pour ses conseils, son aide et son encadrement. Je la remercie également pour la disponibilité et la PATIENCE dont elle a fait preuve pendant la réalisation de ce travail, pour m'avoir accordé sa confiance et avoir accepté d'être la directrice de ma thèse. Mille merci.

Je remercie mes maitres de stage : **Pr Pierre Marty, Pr Valérie Giodanengo, Pr Raymon Ruimi, Pr Giulia Chinnetti, Pr Florence Pedoutour**, les différents médecins que j'ai rencontré au cours de mon cursus : **LILIA, Christelle, Pascal, Martine, Isabelle C, Laurence, Anne, Jacqueline, Géraldine, NICOLAS, Alice, ESTELLE, Isabelle S, Corinne, Danielle, Florence, Annie, Didier, Pierre, Patricia, Maria, Pacale** ainsi que tous les autres médecins qui ont contribué à ma formation. Merci d'avoir pris le temps de m'enseigner votre discipline avec enthousiasme et patience.

À Toute l'Équipe du laboratoire de Génétique Constitutionnelle : **Morgane, Khaoula, Claire, Tina, Samira, Christelle !!!!, Gaëlle** (et ton body jaune), **Charlotte, Sandra, Sabine, Annick, Véro, Amandine, Danielle, Nadia** et toute l'équipe de cytogénétique. Merci pour votre bonne humeur, merci d'avoir pris le temps de partager vos connaissances (même en turc) et votre amitié. Je garde de très bons souvenirs.

À **Bernadette** et **Mathieu** je vous remercie pour m'avoir accordé votre temps et de m'avoir aidé dans la réalisation du projet. Un Grand MERCI.

À Toute l'Équipe du laboratoire de Génétique des tumeurs solides : **Valérie K, Valérie DT, ILAAARIA, Berengère, Thibault, Mika, Annie, Sophie, Frédérique, Audrey, Julie, Nathalie.** Un Grand MERCI.

À tous les cadres, tous les ingénieurs, tous les techniciens et techniciennes des laboratoires de BACTERIO, VIRO, PARASITO, HÉMATO, BIOCH, ONCO-HÉMATO merci pour votre accueil chaleureux et pour tout ce que vous m'avez appris. Une spéciale dédicace à DODO, ARMELLE, et toute l'équipe de nuit du LRR.

À mes co-internes : **Stéphane, Loïc S, Loïc R, Mathilde B, Amaya, Caroline, Mathilde VLGBT, Mathilde Van, Greg, Alicia, Célia, Juliette, Anne, Jacques, Yuta, Lydie, Florent, Alexandre, Samantha, James** : Merci pour les bons moments passés ensemble, les potins imaginaires de midi à l'archet, les parties de baby et les soirées bio. Merci pour votre amitié.

Internat Archet : **Hajar, Ingrid, Thibault, Elsa, Wanda, Khadidja, Marine, Thomas, Louis, Tristan, Gaëlle, Edouard, Martin, Aymen, Adrien, Clémence, Claire** ainsi que tous les autres internes qui ont partagé cette grande colocation et ont participé aux soirées au bord de la piscine.

À Mes coloc du futur **Albé, Sacha, Margaux**, j'ai passé de très bons moments avec vous. Je me suis enrichi de l'esprit de chacun de vous.

À mes amis : **Asma, Yanis, Anne, Edmond, Rinzine, Arona, Nico, HÉLÈNE, Célia, Mika, Kathy, Jimmy**

À **Jean-Claude, Marie-Hélène, Than, et Jean-Baptiste**, merci de m'avoir fait une place dans votre famille.

À mes frères, **Hichem et Zaki**, ravi de vous avoir dans ma vie, d'avoir grandi à vos coté et d'avoir partagé beaucoup de bons moments.

A mes parents **Ouahiba MISSOUNI et Youcef ZEREG**, je vous remercie pour votre soutien sans faille, votre amour, tout ceci n'aurait pas été possible sans vous. Merci pour tout ce que vous m'avez transmis, je ne vous remercierai jamais assez.

À mes grands-parents ; je garde le souvenir de mes vacances chez vous, de très bons souvenirs. **A.E.K** je sais que de là ou vous êtes, vous devriez être très fiers de moi. Je souhaite un bon rétablissement et une longue vie à mes deux manis.

À **Auréli**e, en plus de m'avoir beaucoup aidé pour la réalisation de ma thèse et de mes projets professionnels, tu m'apportes un bonheur quotidien, tu m'entoures d'amour en permanence. Très chanceux de t'avoir dans ma vie.

SOMMAIRE

1.	Table des figures	13
2.	Liste des abréviations.....	15
3.	Résumé.....	16
4.	Introduction.....	18
4.1	Les mitochondries.....	18
4.1.1	Origine.....	18
4.1.2	Structure et dynamique.....	19
4.1.3	La chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative	21
4.1.4	Histologie conventionnelle.....	23
4.1.5	ADN mitochondrial.....	24
4.2	Quantification de l'hétéroplasmie	34
4.2.1	Méthodes d'enrichissement de l'ADNmt.....	34
4.2.2	Les différentes approches de quantification de l'hétéroplasmie de l'ADNmt	40
4.3	Maladies mitochondriales.....	49
4.3.1	Maladies mitochondriales secondaires à une mutation de l'ADNmt.....	49
4.3.2	Maladies mitochondriales secondaires à une mutation de l'ADN nucléaire	52
4.3.3	Stratégie diagnostique	52
4.3.4	Classification des variants de l'ADNmt.....	53
5.	Objectif du travail de thèse	56
6.	Article	58
7.	Discussion et conclusion.....	76
8.	Bibliographie.....	78

1. Table des figures

Figure 1 : Représentation d'une mitochondrie	20
Figure 2 : Fusion et Fission	20
Figure 3 : Dynamique mitochondriale	21
Figure 4 : La phosphorylation oxydative	23
Figure 5 : Coloration histologique conventionnelle	24
Figure 6 : La carte de l'ADN mitochondrial humain.....	26
Figure 7 : Les deux modes de réplication de l'ADNmt.....	26
Figure 8 : Hétéroplasmie de l'ADNmt et effet seuil.....	27
Figure 9 : L'hétéroplasmie de l'ADNmt peut changer tout au long de la vie d'un individu.	28
Figure 10 : Représentation schématique du goulot d'étranglement mitochondrial.	30
Figure 11 : Le cycle de vie de l'ADNmt dans la lignée germinale femelle de souris.	31
Figure 12 : Les 3 Modèles pour le goulot d'étranglement génétique de l'ADNmt,.....	32
Figure 13 : Arbre phylogénétique des Haplogroupes de l'ADNmt humain.	33
Figure 14 : Les méthodes d'isolement de l'ADNmt.	35
Figure 15 : Multiple Displacement Amplification process,	38
Figure 16 : RCA à multiples amorces pour la détection de génomes circulaires.....	38
Figure 17 : MALBAC	39
Figure 18 : Cinétique de PCR converties en logarithme décimal	44
Figure 19 : PCR, analyse en point final	45
Figure 20 : Principe of Terminal fragment length polymorphism (T-RFLP)	46
Figure 21: ARMS-qPCR.....	46
Figure 22 : PCR digitale.....	47
Figure 23 : Vue d'ensemble du séquençage en duplex.....	48
Figure 24 : Signes cliniques observés dans les maladies mitochondriales.	49
Figure 25 : Les principaux syndromes liés à des mutations de l'ADNmt	51
Figure 26 : The range of mtDNA variation and its influence on human disease.....	52
Figure 27 : Biochemical and Molecular Genetic Data.....	71
Figure 28 : Box plots of single cell heteroplasmy quantification of the eight mt-DNA variants.....	73
Figure 29 : Five mt-tRNA secondary structures, demonstrating the location of mt-tRNA variants..	74

Figure 30 : Schematics of the Clover leaf secondary structure of a generic mitochondrial tRNA indicating the different segments and loops	74
Figure 31 : Distribution of pathogenic mutations in human mitochondrial tRNA within a common cloverleaf representation.	74
Tableau 1 : Comparaison des méthodes de détection de l'hétéroplasmie.	40
Tableau 2 : Le système de notation de la pathogénicité.....	55

2. Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNn	AND nucléaire
ADNmt	ADN mitochondrial
ARN	Acide ribonucléique
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomique
ATP	Adénosine triphosphate
COX	Cytochrome c oxydase
CR	Chaine respiratoire
DRP	Dynamin Related Proteins
DSB	Double-strand break
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
HRM	High Resolution Melt Profiling
LHON	Leber hereditary optic neuropathy
MALBAC	Multiple Annealing and Looping-Based Amplification Cycles
MDA	Multiple Displacement Amplification
MFN	Mitofusins
MM	Maladies mitochondriales
mt-ARNt	ARN de transfert mitochondrial
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide
NARP	Syndrome neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire
NGS	Séquençage haut débit
NHEJ	Nonhomologous end-joining
NUMT	Nuclear mitochondrial DNA segment
OH	Origine de la réplication de brin lourd
OL	Origine de la réplication de brin léger
OXPHOS	Phosphorylation oxydative
Pol γ	Polymérase- γ
RCA	Rolloing Circle Amplification
RRF	Ragged Red Fibers
SDH	Succinate déshydrogénase

3. Résumé

La première étape dans la démarche diagnostique des maladies mitochondriales est l'étude exhaustive de l'ADN mitochondrial (ADNmt) par séquençage haut débit (NGS). Cette nouvelle technologie très sensible a révolutionné la pratique des laboratoires de diagnostic génétique. Elle nous a fourni une quantité énorme de données sur le génome humain. Les données récoltées nous ont entre autres permis d'évaluer la diversité humaine à travers les nombreux polymorphismes d'ADNmt, d'identifier de nombreuses mutations pathogènes connues permettant ainsi de diagnostiquer les maladies mitochondriales, et nous ont également confrontés au problème de l'interprétation des variants de signification inconnue.

Distinguer les modifications pathogènes des polymorphismes représente un grand défi pour interpréter les variants mitochondriaux. Les substitutions de bases dans les gènes d'ARNt mitochondriaux (mt-ARNt) sont particulièrement difficiles à interpréter. Les variants mt-ARNt sont des causes courantes de pathologie mitochondriale et sont associés à des taux de transmission élevés ce qui rend leur interprétation très importante pour pouvoir donner des conseils génétiques précis aux patients et à leurs familles.

Les maladies mitochondriales s'exprimant principalement par des signes musculaires sont caractérisées par un taux d'hétéroplasmie plus élevé dans le muscle et dans les urines, et plus faible dans le sang et sur frottis buccal. Toutefois concernant le muscle, le taux d'hétéroplasmie quantifié est une moyenne des taux présents dans les différentes fibres musculaires qui composent l'échantillon. Or, sur une biopsie musculaire d'un patient atteint, un pourcentage variable de fibres musculaires peut présenter un déficit enzymatique en cytochrome c oxydase (COX-négatives) secondaire à la présence d'un variant pathogène. Ce déficit peut être mis en évidence en immunohistochimie. L'étude sur fibre unique permet d'isoler les fibres musculaires et d'y quantifier le taux d'hétéroplasmie d'un variant. La présence d'un fort taux d'hétéroplasmie dans les fibres COX-négatives, contrairement aux fibres sans déficit, est un argument fort en faveur de la pathogénicité de ce variant¹. Actuellement, cette technique, considérée comme un « gold-standard », n'est pas utilisée en routine dans les laboratoires de diagnostic mais uniquement ponctuellement dans un cadre de recherche^{2,3}.

Nous décrivons ici la caractérisation de huit variants de l'ADNmt, dont trois nouveaux variants, chez huit patients différents. Ces patients présentaient un large éventail de

phénotypes cliniques : ataxie cérébelleuse, ophtalmoplégie chronique externe progressive, surdité et fatigabilité musculaire. Les six variants identifiés dans des ARNt (m.5672 T>C, m.12293G>A, m.590A>G, m.15958A>T, m.5703G>A, m.4327T>C) et le variant qui touche le gène qui code l'ATPase 6 (m.9166T>C) ont montré une bonne corrélation de la ségrégation du taux de mutation dans les fibres uniques COX positives et COX négatives avec le phénotype biochimique observé, confirmant ainsi leurs pathogénicité, tandis qu'aucune différence statistiquement significative n'a été observée pour le patient hébergeant les variants m.4935A> G dans le gène MT-ND2.

4. Introduction

4.1 Les mitochondries

Les mitochondries sont des organites cytoplasmiques, présentes dans presque toutes les cellules eucaryotes. Leur nombre varie en fonction des types cellulaires, des tissus et de l'espèce. Les hématies sont dépourvues de mitochondries tandis que les hépatocytes et les cellules musculaires peuvent en contenir plus de 2000. Elles incorporent environ 10% du protéome cellulaire⁴ et jouent un rôle central dans le métabolisme énergétique cellulaire. Elles se déplacent grâce au cytosquelette jusqu'aux sites de forte demande en énergie pour assurer l'apport énergétique nécessaire. Elles sont responsables de la respiration cellulaire et produisent l'énergie nécessaire à la cellule sous forme d'adénosine triphosphate (ATP), grâce au cycle de Krebs, à la phosphorylation oxydative (OXPHOS) et à la β -oxydation des acides gras. Les mitochondries produisent divers cofacteurs métaboliques (NADH, FADH₂), jouent un rôle dans la biogenèse des clusters fer-soufre et sont impliquées dans différents processus tels que la communication, la différenciation, l'apoptose et la régulation du cycle cellulaire.

4.1.1 Origine

Selon la théorie endosymbiotique, il y a environ 1,5 à 2 milliards d'années, une cellule eucaryote primitive aurait absorbé une α -protéobactérie (une bactérie Gram négatif), celle-ci serait devenue une mitochondrie assurant une respiration "primitive" dans une cellule eucaryote hétérotrophe⁵. La double membrane de la mitochondrie serait quant à elle un vestige de la phagocytose initiale : la membrane interne repliée serait l'ancienne membrane bactérienne, tandis que la membrane externe proviendrait de la cellule hôte elle-même. Le génome de *Rickettsia prowazekii* présente de grandes similitudes avec l'ADN mitochondrial ce qui rend ces bactéries très proches des mitochondries d'un point de vue évolutif. Les mitochondries ont perdu 99 % de leurs gènes au cours de l'évolution, la majorité de ces gènes ont été transférés vers le génome nucléaire. Ces gènes codent pour des protéines qui sont synthétisées dans le cytosol puis sont dirigées vers les mitochondries par le biais d'une séquence d'adressage située dans l'extrémité N-terminal de la protéine. Lors du transfert des gènes vers le noyau, les gènes redondants ont été perdus et certains gènes mitochondriaux n'ont pas pu être transférés. La nature fortement hydrophobe de certaines protéines mitochondriales, comme par exemple COX1 et CytB⁶, qui ne peuvent pas traverser la membrane mitochondriale, ainsi que la différence des deux codes génétiques nucléaire et mitochondrial, ont pu limiter le transfert de tous les gènes mitochondriaux.

4.1.2 Structure et dynamique

Les mitochondries sont entourées d'une double membrane qui délimite trois compartiments : le milieu extra-mitochondrial (le cytoplasme de la cellule), l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale⁷ (Figure 1).

Les deux membranes ont des propriétés totalement différentes :

- La membrane mitochondriale externe contient un grand nombre de protéines membranaires, la nature des protéines mitochondriales dépend des espèces et des tissus considérés. Chez l'homme, les mitochondries cardiaques contiennent plus de 615 types de protéines différents⁸. Ce protéome est sensiblement modifié à la suite d'une lésion ischémique cardiaque ce qui suggère que le protéome mitochondrial est régulé de façon vraisemblablement dynamique⁹. Les protéines possédant des signaux d'adressage mitochondrial sont importées dans la mitochondrie grâce aux translocases, ces dernières facilitent l'importation et le tri des protéines dans les sous-compartiments mitochondriaux¹⁰. La membrane externe contient aussi des porines; ce sont des protéines transmembranaires qui permettent le passage des ions et des molécules hydrosolubles de masse molaire < 10.000 Da.
- La membrane interne est très riche en protéines et quasiment imperméable aux ions et aux métabolites hydrosolubles. Les protéines y traversent vers la matrice mitochondriale activement. Elle comporte les différents complexes de la chaîne respiratoire ainsi que l'ATP synthase. Elle est repliée et forme des invaginations appelées « crêtes mitochondriales ». Ces crêtes augmentent la surface de la membrane et la capacité respiratoire. Il y a une relation proportionnelle entre le nombre de crêtes et de replis et la production d'énergie. La morphologie des mitochondries, et notamment des crêtes, est variable d'un type cellulaire à l'autre et impacte le fonctionnement mitochondrial¹¹.

La matrice mitochondriale est constituée de différentes protéines mitochondriales (ribosomes, ARNs de transfert ... etc.) et de plusieurs copies d'ADNmt¹².

Les mitochondries sont organisées en un réseau dynamique dans le cytosol de la cellule. Le réseau mitochondrial est régulé par deux phénomènes : la fission et la fusion (Figure 2).

La fission joue un rôle dans la division cellulaire, elle permet de répartir les mitochondries dans les cellules filles et d'isoler les organites défectueux afin qu'ils soient éliminés par autophagie (Figure 3-A). Le modèle de cycle de vie de la mitochondrie intègre la dynamique mitochondriale et le turnover ; la mitochondrie se déplace de manière cyclique entre un état

post-fusion (réseau) et un état post-fission (solitaire) (Figure 3-B). La fusion est brève et déclenche la fission. Après une fission, la mitochondrie fille peut soit maintenir le potentiel membranaire intact (ligne rouge), soit se dépolariser (ligne verte). Si elle se dépolarise, il est peu probable qu'elle procède à une fusion ultérieure, à moins de se repolariser. Après avoir été dépolarisée et solitaire pendant quelques heures, la mitochondrie est éliminée par autophagie¹³.

La fusion quant à elle permet une meilleure répartition des métabolites et des protéines ainsi que de l'énergie cellulaire produite : en effet, les cellules avec un métabolisme très actif ont fréquemment un réseau mitochondrial très connecté. Elle permet aussi de pallier aux déficiences de la chaîne respiratoire dues aux mutations de l'ADNmt en apportant les protéines et les ARNs codés par des molécules d'ADNmt sauvages¹⁴.

DRP1 est le principal acteur de la fission : cette protéine est relativement bien conservée entre les différentes espèces et chez l'homme. Elle est localisée dans le cytosol et est recrutée à la membrane externe mitochondriale par le biais de protéines adaptatrices. Elle s'oligomérisse et permet la constriction des membranes suivie par la fission en deux mitochondries¹⁵.

La fusion nécessite quant à elle la fusion des membranes externes puis des membranes internes. Les mitofusions MFN1 et MFN2, ancrées à la membrane externe par des domaines transmembranaires, permettent de fusionner les bicouches lipidiques des deux mitochondries.

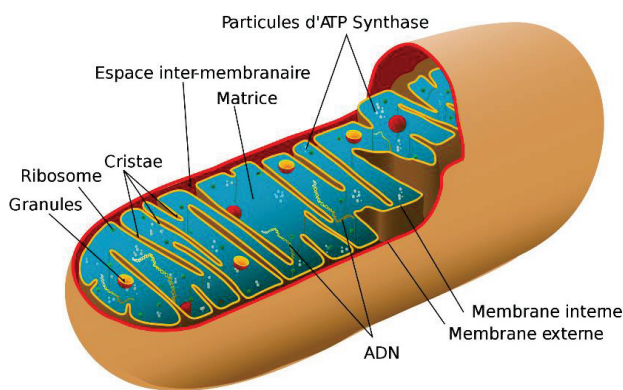


Figure 1 : Représentation d'une mitochondrie

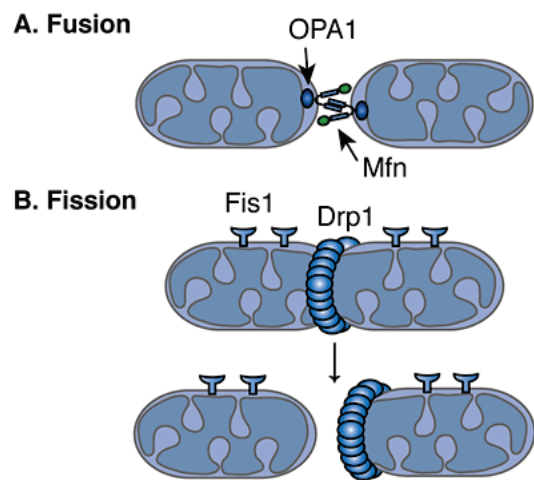


Figure 2 : Fusion et Fission, From Dynamic Relationship of Mitochondria and Neurons

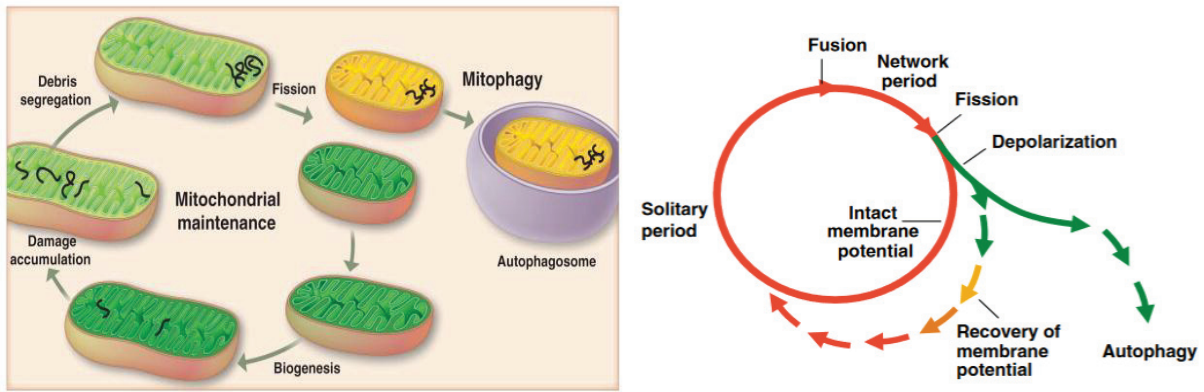


Figure 3 : Dynamique mitochondriale

A- Youle, R. J., & van der Bliek, A. M. (2012) : L'autophagie pourrait purifier le pool cellulaire de mitochondries si les composants délétères (fibres noires) étaient agrégés et séparés de façon asymétrique par fission dans un sous-ensemble de mitochondries. Les mitochondries saines (vertes) sont empêchées de fusionner avec les mitochondries atteintes (jaunes), celles-ci vont être dégradées par mitophagie.

B- Twig G et al 2008 : Un modèle de cycle de vie de la mitochondrie intégrant la dynamique mitochondriale et le turnover.

4.1.3 La chaîne respiratoire et la phosphorylation oxydative

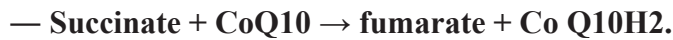
La chaîne respiratoire est un ensemble de quatre complexes multiprotéiques ancrés sur la membrane interne de la mitochondrie. Les complexes CI, CII, CIII et CIV jouent un rôle dans le transport d'électrons et ils sont couplés au complexe enzymatique CV (ATP synthétase), qui catalyse la production d'ATP (Figure 4).

- **Le complexe I (CI) = NADH déshydrogénase** (ou NADH coenzyme Q réductase) : premier complexe de la chaîne respiratoire, il est composé de 46 sous-unités (environ 1000 kDa) dont sept codées par l'ADNmt (ND1 à ND6 et ND4L). Il oxyde le NADH en NAD⁺ tout en catalysant la réduction du coenzyme Q10 (ou ubiquinone) en Co Q10H₂, ubiquinol qui est liposoluble, et permet le passage de 4 protons H⁺ de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire.

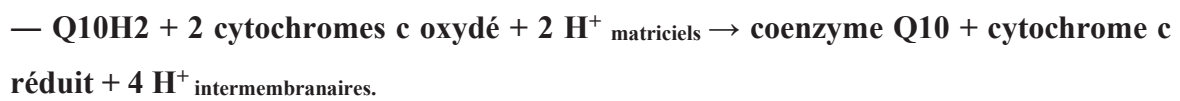


- **Le complexe II (CII) = succinate déshydrogénase** (ou succinate coenzyme Q réductase) : il est constitué de quatre sous unités, toutes sont codées par le génome nucléaire. C'est le deuxième point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire, et il fait partie du cycle de krebs. Il récupère les électrons du FADH₂ et oxyde le succinate en fumarate tout en réduisant le CoQ10 en coenzyme CoQ10H₂. Cette réaction libère moins

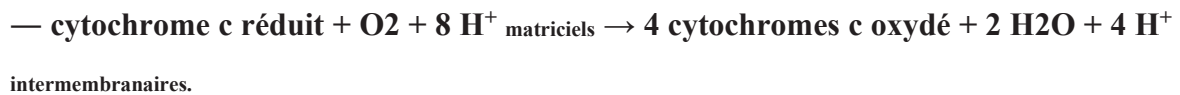
d'énergie que l'oxydation du NADH, ce qui fait que le complexe II ne contribue pas à la génération du gradient de concentration de protons.



- **Le complexe III (CIII) = le Coenzyme Q cytochrome C réductase** : c'est un dimère de deux complexes formés chacun de 11 sous-unités, un cluster [2Fe-2S] et trois cytochromes : un cytochrome c1 et deux cytochromes b. L'atome de fer du complexe III oscille entre l'état d'oxydation ferreux (Fe^{+2}) et l'état ferrique (Fe^{+3}) permettant ainsi le transfert des électrons du Co Q10H2 aux molécules de cytochrome c (cyt c) localisées dans l'espace intermembranaire entraînant ainsi la réoxydation du Co Q10H2 en Co Q10 et la réduction du cyt c. Quatre protons sont transférés par molécule de Q10H2 oxydée.



- **Le complexe IV (CIV) = cytochrome c oxydase** : c'est un complexe protéique de 200 kDa composé de 13 sous-unités, deux groupes hémiques et des cofacteurs. Grâce à son site de liaison avec l'oxygène, il catalyse le transfert des électrons du cytochrome c à l'oxygène pour produire de l'eau. Il pompe quatre protons dans l'espace intermembranaire.



- **Le complexe V (CV) = l'ATP Synthétase** : ce complexe se compose de deux sous-unités principales associées entre elles:

- ✓ F0 : c'est une protéine polaire enchâssée dans la membrane interne, mobile dans le plan de la membrane et elle peut tourner autour d'un axe constitué par des sous-unités de F₁, d'où sa qualification de « rotor ».
- ✓ F1 : c'est une sous-unité globulaire en contact avec la matrice mitochondriale, qualifiée de « stator », et elle comprend trois sous-unités β catalytiques responsables de la synthèse d'ATP.

La synthèse d'ATP nécessite une membrane et un gradient de protons transmembranaire : ces deux prérequis sont nécessaires au fonctionnement de l'ATP synthétase. Les protons suivent le gradient électrochimique et traversent la bicouche lipidique au niveau des rotors F₀, ce qui entraîne leur rotation et provoque des changements de conformation des sous unités de F₁ qui aboutira à la phosphorylation de l'ADP en ATP. Il y a donc conversion de l'énergie osmotique de gradient électrochimique en énergie mécanique de transconformation.

- Le **coenzyme Q** (ou **ubiquinone**) : c'est une protéine qui permet la transition entre le complexe I ou II et le complexe III. Elle peut également accepter des électrons provenant du cytosol.

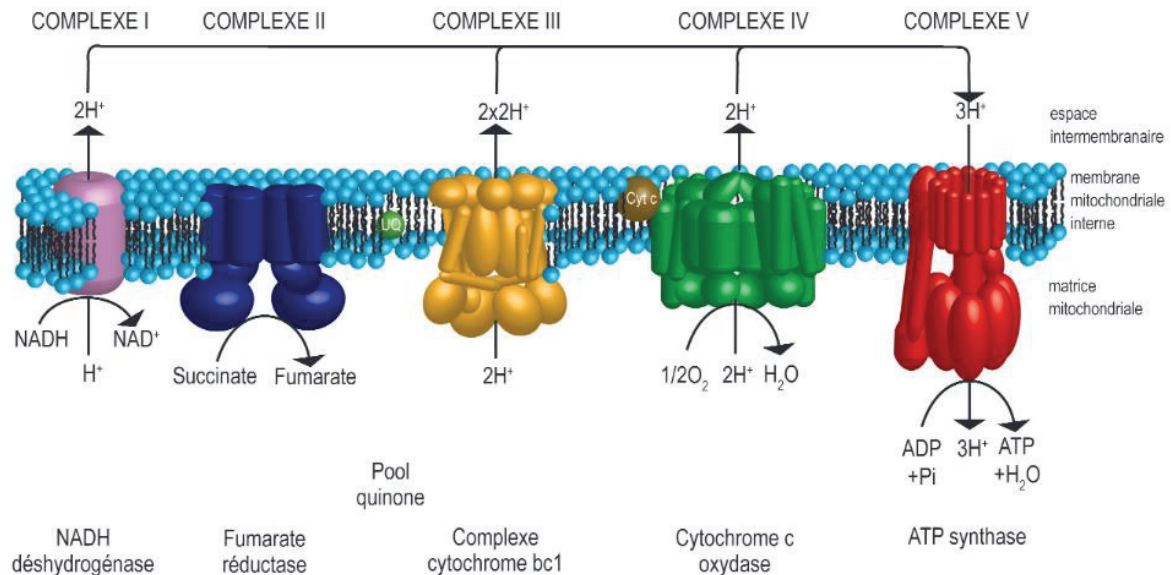


Figure 4 : La phosphorylation oxydative, d'après Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, 2004

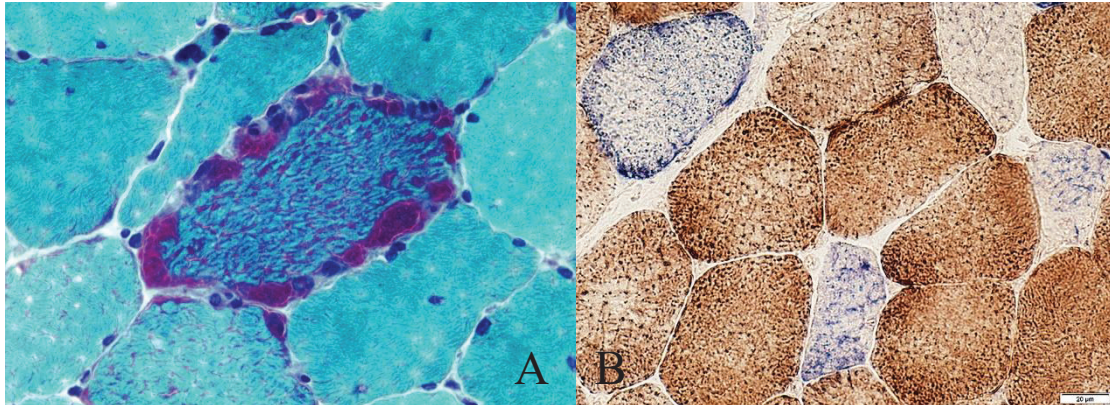
4.1.4 Histologie conventionnelle

Les maladies mitochondriales avec atteinte musculaire peuvent se manifester par des anomalies visibles par les colorations de base en anatomo-pathologie telles que l'hématoxyline-éosine et le trichrome de Gömöri. Ces deux colorations permettent une analyse globale du muscle et mettent en évidence certaines anomalies, non spécifiques, telles que des Ragged Red Fibers (RRF), accumulations sous-sarcolemmales de mitochondries (Figure 5-A).

Les maladies mitochondriales peuvent aussi se manifester par une surcharge lipidique visible par la coloration noir Soudan.

De plus, les techniques oxydatives étudient l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sur tissu congelé. Les fibres de types I et IIA sont plus fortement colorées par ces techniques qui incluent principalement les colorations des enzymes COX et SDH. Bien que les activités COX et SDH puissent être étudiées individuellement, la coloration combinée de ces deux enzymes permet d'identifier et de préciser le taux de fibres déficientes en activité COX (Figure 5B).

- SDH : succinate déshydrogénase (complexe II). Ce complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale est entièrement codé par l'ADNn, son activité n'est généralement pas affectée par l'ADNmt altérée.
- COX : cytochrome c oxydase (complexe IV). Ce complexe de la chaîne respiratoire mitochondriale est codé à la fois par l'ADNmt et l'ADNn. Les sous-unités catalytiques de la COX synthétisées par l'ADNmt sont essentielles pour l'assemblage du complexe IV, les altérations de l'ADNmt impactent le fonctionnement de ce complexe.



*Figure 5 : Coloration histologique conventionnelle
 A- Coloration de trichrome gomori avec RRF
 B- Coloration COX/SDH avec des fibres COX (-) en bleu-gris*

4.1.5 ADN mitochondrial

Les mitochondries ont leur propre ADN : chez l'Homme, l'ADNmt est une molécule d'ADN double brin, extra chromosomique, circulaire, compact d'une taille de 16,569 kb, qui se réplique de manière autonome, héritée de la mère (les mitochondries proviennent toutes de l'ovule de la mère), codant pour 22 ARNt qui reconnaissent 60 codons, 2 ARNr et 13 protéines. Ces protéines sont des sous-unités structurelles de la chaîne respiratoire mitochondriale, elles comprennent (Figure 6) :

- La NADH déshydrogénase 1 (complexe I) : ND1 à ND6 et ND4L
- Le cytochrome b (complexe III) : CYB
- Le cytochrome c oxydase I (complexe IV) : COX1 à COX3
- L'ATP synthase (complexe V) : ATP6 et ATP8

L'ADN mitochondrial code également pour certains peptides courts dont les rôles et les mécanismes d'action ne sont pas bien compris¹⁶.

Chaque cellule contient plusieurs mitochondries et chaque mitochondrie contient plusieurs copies d'ADNmt. La majorité des protéines présentes dans les mitochondries (mitoprotéome)

sont codées par le génome nucléaire (on en compte plus de 1500) et sont ensuite importées dans le cytoplasme mitochondrial¹⁷.

Le génome mitochondrial possède plusieurs caractéristiques:

- ✓ L'absence d'introns et de séquences répétées
- ✓ L'existence d'une seule région non-codante (taille \approx 1 kb) : appelée boucle de déplacement ou D-loop. La D-loop contient les séquences nécessaires à l'initiation de la réplication et de la transcription de l'ADNmt.
- ✓ Une molécule d'ADN deux brins avec :
 - Un brin lourd extérieur « H » (heavy), qui porte la majorité des gènes
 - Un brin léger intérieur « L » (light).

La distinction léger/lourd reflète le contenu en guanine du brin, qui affecte le poids moléculaire.

- ✓ Un code génétique qui diffère du code génétique du génome nucléaire. Pour l'ADNmt des vertébrés, les codons AUA et AUG codent tous les deux pour la méthionine, le codon UGA pour le tryptophane (il code pour un codon stop dans le génome nucléaire), ainsi que pour les AGA et AGG qui sont des codons stop (ils codent pour l'arginine dans le génome nucléaire).
- ✓ Un empilage en nucléoïdes : chaque nucléoïde contient une ou deux molécules d'ADNmt¹⁸.
- ✓ Un nombre de copies élevé : dans les cellules humaines, le nombre de copies d'ADNmt varie d'environ 100 copies dans le sperme à des centaines de milliers dans un ovocyte non fécondé. Le nombre de copies semble être étroitement régulé et peut varier dans certains types de cellules dans le temps, par exemple le nombre peut augmenter dans les cellules musculaires avec l'exercice physique¹⁹. Bien que les mécanismes de réparation soient présents dans la mitochondrie, la réparation de l'ADNmt serait moins efficace que la réparation de l'ADN nucléaire. Ce manque de performance de la réparation est compensé en partie par le nombre élevé de copies de l'ADNmt qui protège contre les effets délétères des mutations stochastiques (aléatoires)¹⁹.
- ✓ La notion d'hétéroplasmie : l'hétéroplasmie correspond au fait que ces copies d'ADNmt puissent ne pas avoir toutes la même séquence.
- ✓ Une hérédité maternelle : comme l'ADNmt est hérité exclusivement de la lignée maternelle, il subit une recombinaison intermoléculaire négligeable, qui se manifeste au niveau de la population²⁰, de sorte que les lignées d'ADNmt sont largement considérées comme clonales. La clonalité de l'ADNmt permet de faire les analyses

phylogénétiques, les études médico-légales et les études de la transmission de mutations pathogènes de l'ADNmt au sein de familles.

4.1.5.1 La réplication de l'ADNmt

La réplication de l'ADNmt est réalisée par un ensemble de plusieurs protéines (le réplisome) comprenant notamment l'ADNmt polymérase- γ (Pol γ), une hélicase (Twinkle; également connue sous le nom de PEO1) et une protéine de liaison à l'ADN simple brin d'ADNmt, mtSSB. Deux modèles de réplication de l'ADNmt ont été proposés (Figure 7). Dans le modèle «déplacement de brin» ou «asynchrone», la réplication est initiée par la fixation d'une polymérase γ au niveau de l'origine de la réplication de brin lourd (OH, également appelé OriH), les deux brins se séparent au niveau de la boucle de déplacement (D loop) de l'ADNmt et la synthèse du brin lourd commence, en prenant comme matrice le brin léger, puis se poursuit dans le sens des aiguilles d'une montre jusqu'à ce que l'origine de la réplication du brin léger (OL) soit exposée, permettant ainsi à une autre polymérase γ de se fixer et à la synthèse du brin léger de se dérouler dans le sens inverse des aiguilles d'une montre jusqu'à ce que toute la molécule soit copiée.

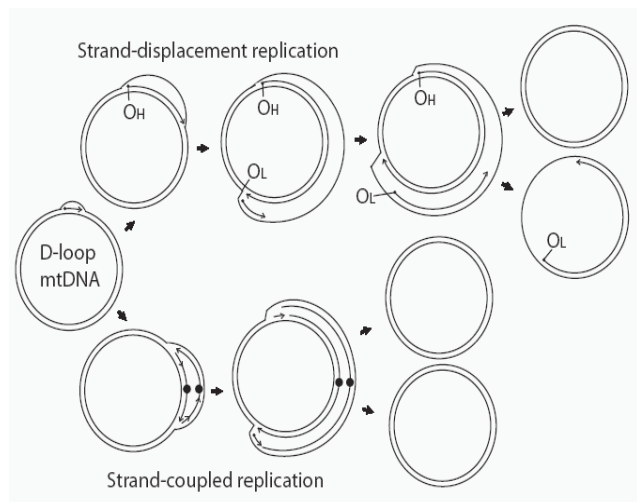
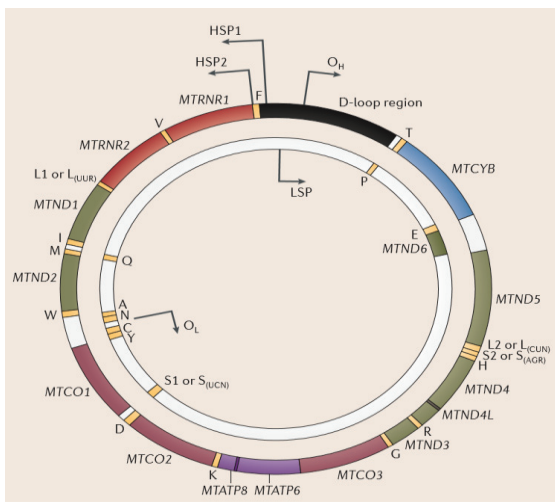


Figure 6 : La carte de l'ADN mitochondrial humain. By James B. Stewart

OH and OL: Origins of heavy and light strand replication, respectively; ND1-ND6: Subunits of NADH dehydrogenase (ETC complex I) subunits 1 through 6; COX1-COX3: Subunits of cytochrome oxidase subunits 1 through 3 (ETC complex IV); ATP6 and ATP8: Subunits 6 and 8 of mitochondrial ATPase (complex V); Cyt b:

Figure 7 : Les deux modes de réplifications de l'ADNmt (adapted from Brown et al, 2005)

Des études sur les souris ont montré que les mutations dans des segments spécifiques de la D loop et l'origine de la réplication du brin léger réduisaient l'efficacité de la réplication des molécules d'ADNmt porteurs de ces mutations. Ces résultats appuient fortement le modèle de déplacement de brin²¹.

Le deuxième modèle proposé est une réplication symétrique bidirectionnelle couplée des deux brins, elle pourrait se produire dans certaines circonstances cellulaires et en particulier dans les phases de croissance. La réplication est initiée à partir de multiples origines réparties sur un fragment 3' de la boucle D et se poursuit dans les deux sens en « bulles » de réplication.

4.1.5.2 Hétéroplasmie de l'ADNmt

L'hétéroplasmie correspond à la présence d'un mélange ADNmt muté et sauvage dans une même cellule. Étant donné qu'il existe plusieurs copies d'ADNmt dans chaque cellule, quand les mutations affectent toutes les molécules, on parle d'homoplasmie.

Le niveau d'hétéroplasmie peut varier entre les cellules d'un même tissu ou d'un même organe, d'un organe à l'autre d'une même personne et entre les individus d'une même famille. Si une mutation est pathogène, la cellule peut généralement tolérer un pourcentage élevé de ce variant avant que le seuil biochimique ne soit dépassé et qu'un défaut de la chaîne respiratoire ne soit détecté (Figure 8). En règle générale, ce seuil est supérieur à 80%, ce qui suggère que la plupart des mutations d'ADNmt sont haplo-insuffisantes¹.

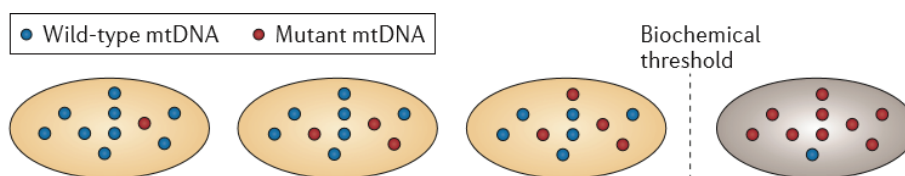


Figure 8 : Hétéroplasmie de l'ADNmt et effet seuil. By James B. Stewart

Lors de la division cellulaire, les molécules d'ADNmt passent aux deux cellules filles. Si un variant hétéroplasmique est présent, alors, chaque cellule fille peut recevoir une proportion différente de molécules mutées. Ce processus s'appelle la ségrégation végétative et fournit une explication des changements observés dans le niveau d'hétéroplasmie dans les cellules en division, in vivo et in vitro (Figure 9).

Pour les variants génétiques neutres, le niveau global de la mutation restera constant dans une population infinie, mais dans un pool fini de cellules en division, le niveau de mutation peut augmenter ou diminuer en raison d'une dérive génétique aléatoire. En revanche, si la mutation

est pathogénique, elle impacte la fonction cellulaire et empêche ainsi la réplication ultérieure de la cellule : la sélection contre la mutation aura lieu au niveau cellulaire. Cependant, des cultures cellulaires ont montré que les mutations de l'ADNmt peuvent augmenter, diminuer, ou rester stable. Ces observations ne peuvent pas être expliquées uniquement par la dérive mitotique aléatoire d'ADNmt. Les mécanismes sous-jacents de la ségrégation des molécules d'ADNmt mutées ne sont pas complètement compris, mais il est possible que les gènes nucléaires influencent le schéma de ségrégation²².

L'ADNmt est continuellement détruit et répliqué, même dans des cellules qui ne se divisent pas²³, selon un processus appelé réplication relaxée (relaxed replication). Aucun mécanisme cellulaire n'existe pour garantir que chaque molécule d'ADNmt soit copiée en nombre égal, ce processus aléatoire peut entraîner des modifications significatives des niveaux d'hétéroplasmie dans certaines cellules. Cependant, s'il existait un biais en faveur (ou contre) un variant, cela influencerait le sens de la réplication relaxée et orienterait l'accumulation de l'un des variants moléculaires. Par exemple la délétion de l'ADNmt donne une molécule d'ADNmt plus petite que la molécule sauvage ce qui la rend plus rapidement répliquée. Cela pourrait conduire à un avantage réplcatif en faveur des petites molécules et expliquerait pourquoi les délétions s'accumulent avec l'âge²⁴.

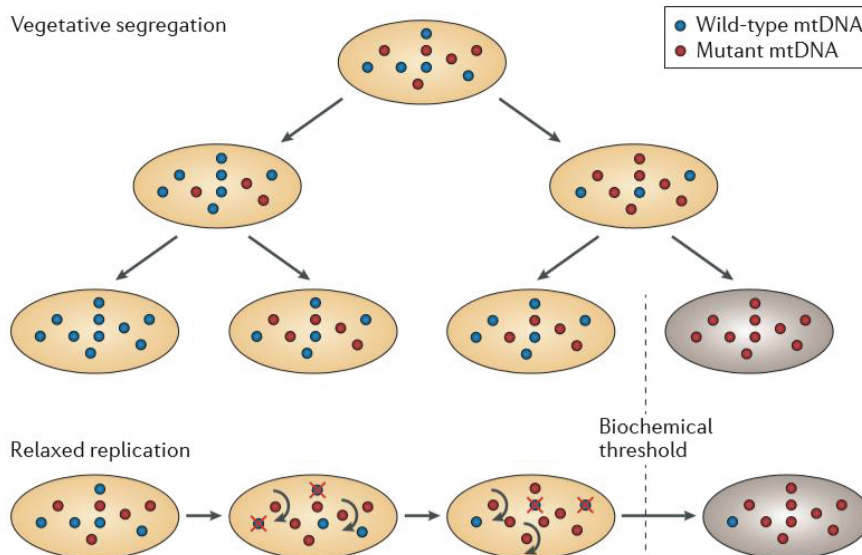


Figure 9 : L'hétéroplasmie de l'ADNmt peut changer tout au long de la vie d'un individu. By James B. Stewart

Il n'est pas clair si la cause réelle de l'augmentation du taux d'hétéroplasmie est une perte d'ADNmt de type sauvage, un excès d'ADNmt muté ou une combinaison des deux. L'hypothèse de maintien du type sauvage prédit une prolifération non sélective d'ADNmt de type sauvage et muté en réponse à un défaut moléculaire. Lorsqu'une mutation touche une molécule d'ADNmt, la cellule répond en répliquant la totalité du contenu en ADNmt pour rétablir l'équilibre. Le signal nucléaire initiant la réplication ne peut pas distinguer l'ADNmt muté du sauvage : cela entraînerait la prolifération de tout l'ADNmt dans la cellule ce qui engendrerait une augmentation de l'ADNmt muté. En réalité la réplication fidèle d'unités de ségrégation implique un rapport mutant sauvage fixe, mais des décalages se produisent lors de la rupture temporaire de la réorganisation des unités de ségrégation²², favorisant l'amplification des unités de ségrégations mutées. Quand le pourcentage des molécules mutées dépassera 50%, le mécanisme correctif de prolifération non sélective conduira à la réplication préférentielle de molécules mutées (au détriment de celles de type sauvage) jusqu'à ce que le seuil biochimique soit atteint et qu'un défaut de la chaîne respiratoire soit détecté.

4.1.5.3 L'hypothèse de goulot d'étranglement génétique de l'ADNmt (bottleneck hypothesis)

En termes simples, cela ressemble à un effet d'échantillonnage statistique, dans lequel de petits échantillons aléatoires prélevés dans une population plus grande contiendront des proportions variables d'un allèle particulier, et la différence entre chaque échantillon sera plus grande si la taille de l'échantillon est plus petite. L'hypothèse postule que seule une faible proportion du nombre total de génomes mitochondriaux est transmise de la mère à sa descendance (Figure 10). Le niveau d'hétéroplasmie peut changer de façon marquée pendant la transmission de la lignée germinale. Une mutation hétéroplasmique de novo pourrait devenir fixe et homoplasmique en deux à trois générations²⁵.

Il a été admis que le principal mécanisme qui régit l'évolution des niveaux d'hétéroplasmie dans les ovocytes était la dérive génétique aléatoire; les mutations agissent comme des variants neutres et se séparent sans biais sélectif. Mais l'analyse de la descendance suggère l'existence d'un mécanisme de sélection négative qui vise à limiter la transmission de ces mutations. Par exemple une mutation de l'ADNmt provoque un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire et perturbe secondairement le potentiel de la membrane mitochondriale. L'importation des protéines mitochondriales d'origine nucléaire nécessite un potentiel stable de la membrane mitochondriale. La perturbation de ce potentiel diminue l'importation des

protéines mitochondriales nucléaires, entre autres celles qui jouent un rôle dans la réplication mitochondriale, limitant ainsi leur réplication. Ce mécanisme de contrôle favorise donc la réplication des mitochondries qui ont une chaîne respiratoire intègre et donc ADNmt non muté.

Chez les embryons de souris, jusqu'à environ 7,5 jours après le début du développement, l'ADNmt ne se réplique pas. Au-delà de ce point, le nombre de copies cellulaires augmente rapidement dans les cellules germinales embryonnaires en développement. La reprise de la réplication se produit au moment où le nombre total de génomes dans la cellule est au plus bas (Figure 11). À ce stade, les molécules d'ADNmt portant une mutation auront la plus grande influence sur la cellule, compromettant potentiellement la réplication de l'ADNmt et de la cellule germinale, altérant ainsi leur transmission. Mais ce filtre n'est pas parfait, certaines variations de l'ADNmt, par exemple celles qui n'impactent pas le potentiel de membrane, échappent à ce mécanisme de contrôle et certaines mutations apparaissent après ce point de contrôle^{25,26}.

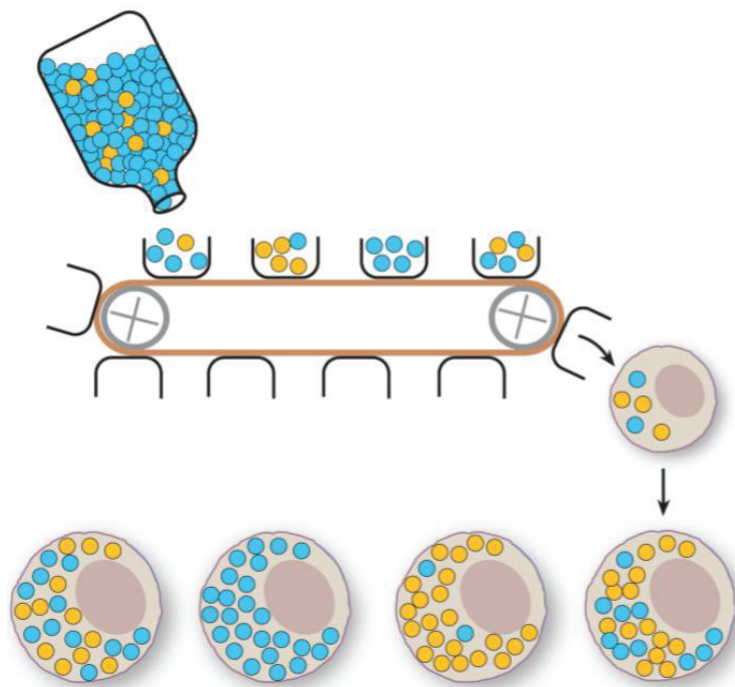


Figure 10 : Représentation schématique du goulot d'étranglement mitochondrial. By James B. Stewart, 2014

Un grand nombre de molécules d'ADNmt sont présentes dans le pool maternel d'ADNmt (bouteille). La figure représente deux génotypes (cercles bleus et jaunes). La génération d'un ovocyte implique le sous-échantillonnage de seulement quelques molécules d'ADNmt du pool maternel d'ADNmt (seaux sur une bande transporteuse), qui seront transférées dans l'ovocyte en développement et seront largement répliquées. L'effet de ce mécanisme de goulot d'étranglement mal compris est que la proportion des deux génotypes peut varier considérablement d'un ovocyte à l'autre.

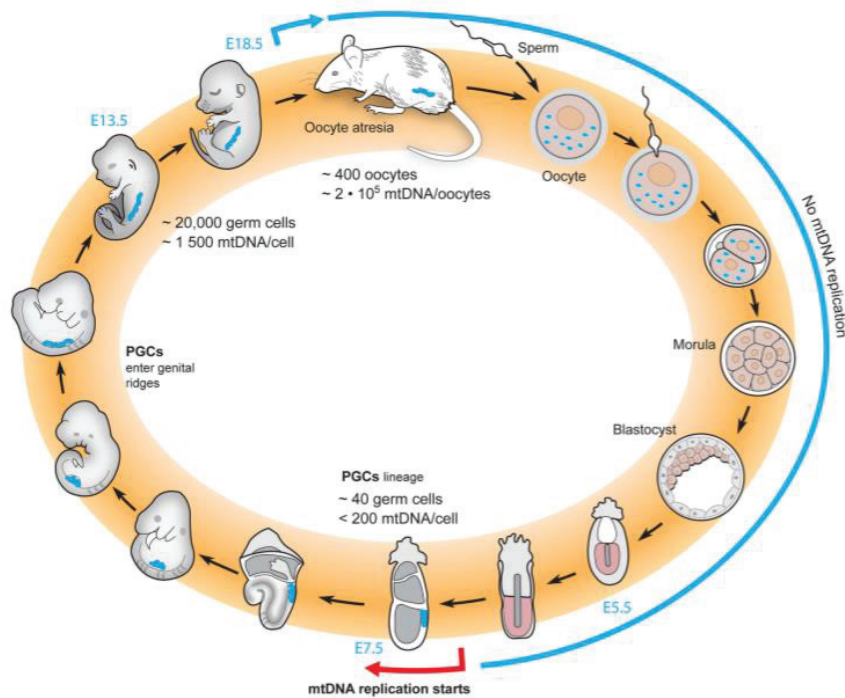


Figure 11 : Le cycle de vie de l'ADNmt dans la lignée germinale femelle de souris. by James B. Stewart, 2014.

La quantité totale d'ADNmt reste inchangée du stade ovocyte au stade blastocyste, ce qui entraîne une dilution du nombre de molécules d'ADNmt par cellule à chaque division cellulaire. La ré-initiation de la réplication de l'ADNmt ne se produit qu'au stade post-implantatoire. À environ 7,5 E, un goulot d'étranglement physique avec un très petit nombre de molécules d'ADNmt par cellule a été signalé, puis la réplication reprend pour augmenter la teneur en ADNmt de l'embryon.

Dans la figure 12 : trois mécanismes sont proposés pour expliquer le goulot d'étranglement mitochondrial, la sévérité croissante fait référence aux conséquences cliniques d'un pourcentage plus élevé d'ADNmt mutant :

a. La variabilité des niveaux d'hétéroplasmie est générée par la partition inégale des génotypes de type sauvage (bleu) et mutant (rouge) au cours de la division cellulaire. Cela conduit à une dérive accélérée des taux d'hétéroplasmie, qui résulte principalement de la réduction spectaculaire du nombre de copies d'ADNmt immédiatement avant l'expansion de la population de cellules germinales primordiales (PGC) (Cree et al., 2008).

b. Chaque nucléoïde contient plusieurs copies d'ADNmt identiques. La variation de l'hétéroplasmie est générée par la ségrégation inégale des nucléoïdes homoplasmiques dans les PGC (Cao et al., 2007).

c. La réplication d'une sous-population de génomes mitochondriaux conduirait également à un effet de goulot d'étranglement. Certaines données indiquent que cela pourrait se produire pendant la maturation postnatale des ovocytes (Waietal., 2008).

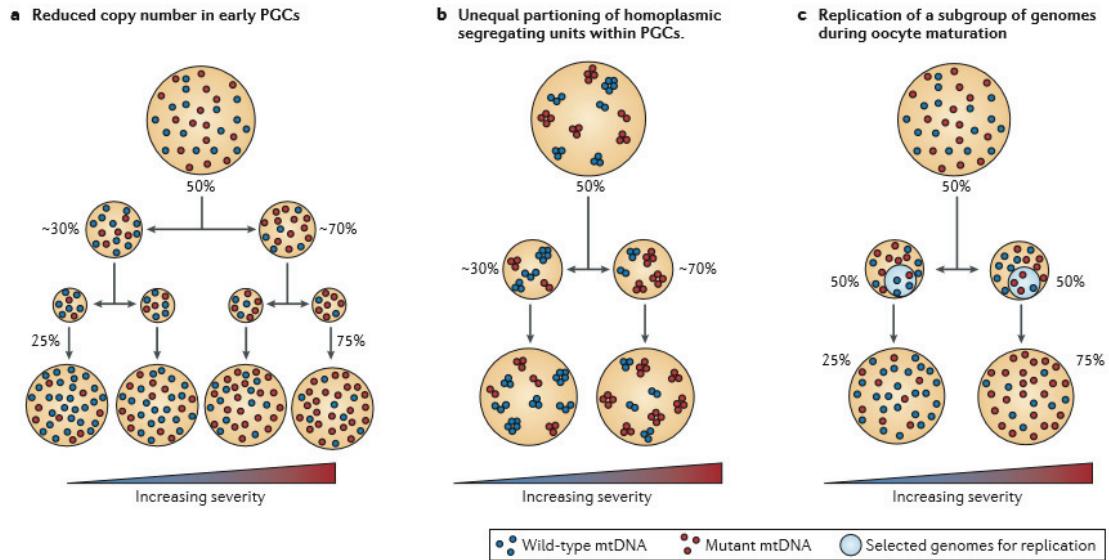


Figure 12 : Les 3 Modèles pour le goulot d'étranglement génétique de l'ADNmt, by James B. Stewart, 2014

4.1.5.4 ADNmt chez les populations humaines

L'ADNmt est particulièrement étudié en génétique de population pour tracer et suivre la migration et la colonisation de la planète. Les spécificités de l'ADNmt à savoir ; la transmission uniparentale de l'ADNmt et l'absence de recombinaison intermoléculaire, font que les variants en son sein restent limités à des groupes ethniques spécifiques. De nouvelles mutations de l'ADNmt sont apparues et continuent de se produire au sein de différentes lignées maternelles. Ces mutations initialement à l'état hétéroplasmique ont survécu au goulot d'étranglement génétique et se sont finalement fixées, après plusieurs générations, à l'état homoplasmiques au sein d'une lignée maternelle donnée. Ces études ont permis aussi de tracer le plus récent ancêtre (datée d'environ -150 000 ans) matrilineaire commun à l'humanité par lignée maternelle. Situé en Afrique, il est connu sous le nom de l'Ève mitochondriale (Figure 13).

Les groupes d'haplotype similaire, qui partagent plusieurs variants communs, sont appelés haplogroupes, typiquement présents chez plus de 5% de la population. Par exemple des études récentes ont montrés que les niveaux d'ADNmt et d'ARNmt, la synthèse des protéines mitochondriales, les niveaux et l'activité de la cytochrome oxydase, la consommation normalisée d'oxygène, le potentiel et la capacité de croissance de la membrane mitochondriale interne sont différents entre les cellules cybrides de l'haplogroupe H (environ 40% des Européens) et l'haplogroupe Uk (environ 25% des Européens)²⁷. De même, certains

haplogroupes sont plus enclins à développer une défaillance multiviscérale suite à un sepsis (J, K, T) que d'autres haplogroupes (HV). Ceci laisse penser que l'exposition antérieure à une maladie infectieuse aurait conduit à la sélection de variants particuliers d'ADNmt qui auraient conféré un avantage en terme de survie²⁸. En revanche, l'haplogroupe HV, qui a un avantage en cas de sepsis, est un facteur de risque pour les maladies dégénératives tardives notamment la maladie de Parkinson (pléiotropie antagoniste)²⁹.

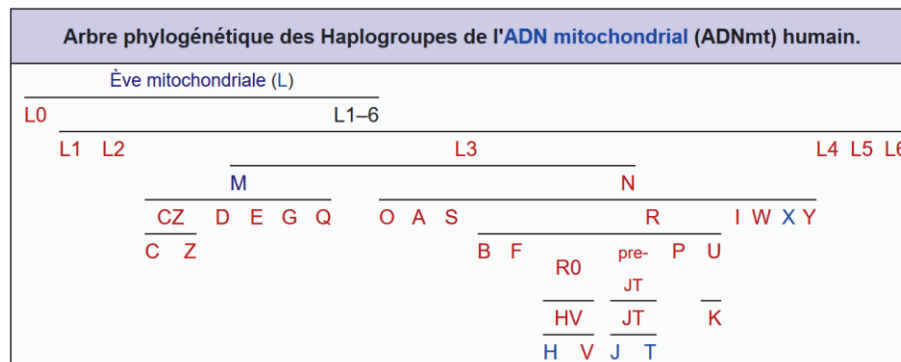


Figure 13 : Arbre phylogénétique des Haplogroupes de l'ADNmt humain. From wikipedia

4.1.5.5 Les pseudogènes mitochondriaux ou Nuclear mitochondrial DNA sequences (NUMTs)

Ce sont des pseudogènes dans l'ADN nucléaire qui dérivent de l'ADN mitochondrial. Leur taille varie de 39 pb à la quasi-totalité de la séquence mitochondriale. Un total de 755 NUMTs ont été identifiés dans la version hg19 du génome humain de référence³⁰. Par exemple, le chromosome humain 8 contient presque toute une séquence d'ADNmt insérée dans le premier intron du gène *SDC2*³¹. Le transfert de matériel génétique mitochondrial dans le génome nucléaire des eucaryotes est un processus évolutif. Chez la levure, cela se produit lors de la réparation de cassures double brin par nonhomologous end-joining (NHEJ) repair ou par double-stranded breaks (DSB)³². L'ADN inséré subit des modifications, mutations ponctuelles, délétions, inversions, duplications et séquences déplacées. L'insertion de NUMTs n'est pas rare, chez l'homme, elle a été estimée à environ 5×10^{-6} par cellule germinale et par génération³².

Les NUMTs peuvent contribuer à l'évolution des gènes mais ils ont été incriminés directement dans certaines pathologies génétiques. Ils peuvent interférer avec la détection de l'hétéroplasmie et entraver les études sur les maladies mitochondriales³³.

Certains NUMTs viennent directement de l'insertion d'ADNmt tandis que d'autres sont probablement dus à la duplication de NUMTs précédemment insérés. Parmi ces NUMT identifiés quelques-uns (~ 4) seraient uniques à chaque individu ce qui rend la situation particulièrement complexe.³¹

4.2 Quantification de l'hétéroplasmie

La caractérisation des séquences du génome humain mitochondrial et la quantification précise du taux d'hétéroplasmie sont importantes pour le diagnostic moléculaire des maladies mitochondriales. Différentes techniques ont été utilisées dont le séquençage Sanger, l'HPLC (High Performance liquid chromatography), la PCR digitale ou l'HRM (High Resolution Melt Profiling)³⁴. Actuellement, nous utilisons en routine au laboratoire la PCR-RFLP fluorescente. Cependant, déterminer simultanément la séquence de l'ADNmt et les taux d'hétéroplasmie des variants identifiés avec une technique unique est l'objectif des nouvelles approches basées sur le NGS.

La détection et la quantification précises de l'hétéroplasmie mitochondriale dépendent de plusieurs facteurs dont notamment la qualité du matériel de départ et la stratégie d'enrichissement initiale.

4.2.1 Méthodes d'enrichissement de l'ADNmt

Le type de tissu et la stratégie d'enrichissement influent sur le nombre de variants détectés, en particulier les variants de basse fréquence³⁵. On peut diviser les différentes méthodes d'enrichissement en deux catégories principales, l'isolement et l'amplification.

4.2.1.1 Isolement de l'ADNmt

Il existe un risque de contamination par les NUMTs lors de l'isolement de l'ADNmt à partir des échantillons biologiques. Compte tenu du nombre élevé de copies de molécules d'ADNmt par rapport au génome nucléaire, la contamination n'aurait pas un effet important sur la détection des variations hétéroplasmiques avec une fréquence d'hétéroplasmie élevée. Cependant l'impact des NUMTs devrait être pris en compte lors de l'évaluation des taux faibles d'hétéroplasmie.

Les méthodes d'isolement sont basées sur la séparation des organites afin d'obtenir des mitochondries intactes. Si on se base sur le rendement et la qualité de l'ADNmt (plutôt que de l'obtention de mitochondries intactes) on peut citer deux méthodes (Figure 14) :

1. Centrifugation en gradient de densité : on peut utiliser la centrifugation différentielle pour séparer les différents organites de la cellule afin d'extraire l'ADN. Lors de la centrifugation, dans le gradient de densité, les organites flottent ou coulent en fonction de leurs densités. Le chlorure de césium (CsCl) est largement utilisé comme milieu neutre typique, car il empêche les organites de gagner ou de perdre de l'eau et maintient donc les mitochondries en bon état. La centrifugation dans un gradient de densité diminue considérablement la quantité d'ADN nucléaire et évite l'interférence des NUMTs. Cependant cette méthode est chronophage et nécessite une grande quantité d'échantillons, ce qui limite son utilisation.
2. Capture Array : Les sondes de capture des cibles sont des oligonucléotides simples brins avec des séquences complémentaires qui s'hybrident sélectivement aux régions génomiques d'intérêt, utilisées en solution ou sur une surface. Les sondes de captures sont fixées de manière réversible soit sur un support solide soit sur une bille. La récupération des sondes permet le séquençage sélectif des régions génomiques d'intérêt.

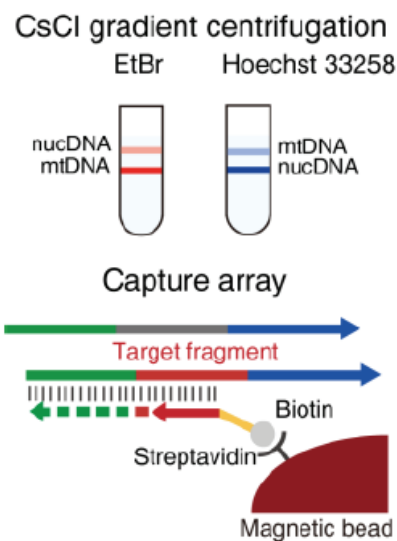


Figure 14 : Les méthode d'isolement de l'ADNmt. From Mengqin Duan, 2018

4.2.1.2 Amplification de l'ADNmt

Les méthodes de capture directe nécessitent une quantité suffisante d'ADNmt. Les biopsies musculaires ou autres n'en fournissent souvent pas assez, en conséquence, il peut être nécessaire d'amplifier les molécules d'ADNmt.

1. Polymerase Chain Reaction (PCR), deux méthodes sont utilisées :

- 1.1. La première méthode est appelée 'primer-walking' ou amorce en marche. Elle nécessite deux ou plusieurs paires d'amorces (multi-amorces) avec des régions d'amplicons qui se chevauchent. Cependant, la variation considérable de degré de couverture des différentes régions de l'ADNmt biaise la quantification d'hétéroplasmie.
- 1.2. La deuxième méthode est la 'long-range PCR' (LR-PCR) ou PCR long fragment. C'est la technique choisie dans notre laboratoire, c'est une option très intéressante pour l'enrichissement de la totalité de l'ADNmt ³⁶. L'ADNmt est amplifié en deux longs fragments chevauchants. Un couple de primers est localisé dans la région régulatrice (16024-576) qui n'est pas déléetée, PCR-XL1, tandis que les primers de la PCR XL2 sont situés dans la région classiquement déléetée (9411-9027). Après une purification pour éliminer les amorces de PCR, le produit PCR est mélangé (XL1+XL2) selon un rapport équimolaire.

Ensuite, les produits issus des deux approches sont séquencés par séquençage massif parallèle. La couverture des produits de la PCR multi-amorces est meilleure dans les régions qui se chevauchent et elle est plus ou moins médiocre dans les régions uniques, tandis que la LR-PCR fournit une couverture harmonieuse dans tout le génome mitochondrial. Les deux techniques comportent les biais de la PCR.

2. Whole Genome Amplification (WGA) ou Amplification du génome entier : c'est une méthode robuste pour l'amplification du génome entier, elle nécessite une quantité infime d'ADNmt de départ. Elle s'appuie sur l'amplification par PCR ou sur l'amplification isotherme :

2.1. L'amplification par PCR

- Primer-extension pre-amplification (PEP)
- Degenerate oligonucleotide primed PCR (DOP-PCR)
- Ligation-mediated PCR (LM-PCR)

2.2. L'amplification isotherme

- Multiple displacement amplification (MDA)
- Multiple annealing and looping-based amplification cycles (MALBAC)

L'amplification isotherme regroupe un grand nombre de méthodes. Je développerai les deux méthodes les plus utilisées pour amplifier l'ADN mitochondrial.

2.2.1 Multiple displacement amplification (MDA) ou amplification par déplacement multiple. Il existe deux kits commerciaux :

1-REPLI-g Mitochondrial DNA Kit (Qiagen Inc.)³⁷ (Figure 15) :

- La réaction commence par une dénaturation alcaline douce et une hybridation d'amorces hexamères aléatoires (random primers) qui garantissent une amplification homogène sur tout le génome.
- Une enzyme de haute-fidélité, la Phi29 ADN polymérase, assure une amplification isothermique (à température constante) de l'ADN et ne nécessite donc pas de thermocycleur. La Phi29 possède une activité 3' → 5' de relecture (proofreading) lui conférant un taux d'erreur 100 fois inférieur (taux d'erreur de 1 sur 10⁶ à 10⁷ bases) par rapport aux Taq polymérases classiquement utilisées dans les techniques de PCR assurant une amplification non biaisée du génome.
- Lorsque la synthèse de l'ADN passe au site de départ suivant (primer suivant), la polymérase débranche le brin d'ADN nouvellement produit et continue son élongation. Ainsi, elle peut produire des amplicons d'ADN de grande taille (les brins générés par cette technique peuvent atteindre 100 kb).
- Des amorces supplémentaires se fixeront sur les brins générés et un déplacement de brin sur la matrice nouvellement synthétisée aboutissent à un réseau d'ADN très ramifié.

2-La méthode MitoRS (for Mitochondrial DNA analysis by Rolling circle amplification and Sequencing RCA).

La méthode RCA est un processus d'amplification d'acides nucléiques ADN ou ARN circulaire basé sur la technique MDA. Elle est utilisée pour la duplication et la réplique de certains plasmides et génome de bactériophages et de viroïdes (une particule virale simple, composée d'un seul ARN circulaire sans capsid). La RCA enrichit les modèles circulaires par rapport aux modèles linéaires. Cette méthode repose également sur les propriétés de l'ADN polymérase Φ 29, qui possède une activité de proofreading et une processivité importante. La synthèse continue de l'ADN peut produire de multiples copies linéaires monocaténares de l'ADNmt, appelée concatémère (Figure 16 (b,c)). En effet, la nature circulaire de l'ADNmt lui permet un enrichissement spécifique et efficace, un seul événement d'amorçage générera plusieurs copies de l'ADNmt (matrice circulaire). Alors que l'ADNn (matrice linéaire)

donnera un rapport amplicon/matrice égal à 1 (Figure 16 (a)). Compte tenu du faible besoin en matériel de départ (elle nécessite 5 ng d'ADN total), elle permet la quantification précise de l'hétéroplasmie dans des cellules uniques. Les amorces aléatoires et la RCA donnent une configuration universelle à cette approche, non spécifique à une espèce et insensible aux NUMTs et au polymorphisme de l'ADNmt.

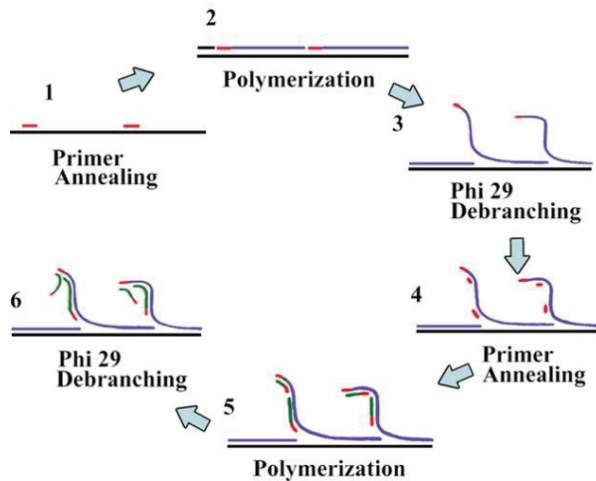


Figure 15 : Multiple Displacement Amplification process, By Fechner & McGovern, 2011

La MDA se déroule en trois phases: primo, la liaison des amorces à la matrice d'ADN de l'échantillon, suivie de la synthèse de l'ADN réalisée par l'ADN polymérase $\phi 29$. Lorsque la synthèse de l'ADN atteint l'amorce suivante, le brin nouvellement formé est déplacé et fonctionne comme une nouvelle matrice illustrée aux étapes 4, 5 et 6 (Tindall & Kunkel, 1988).

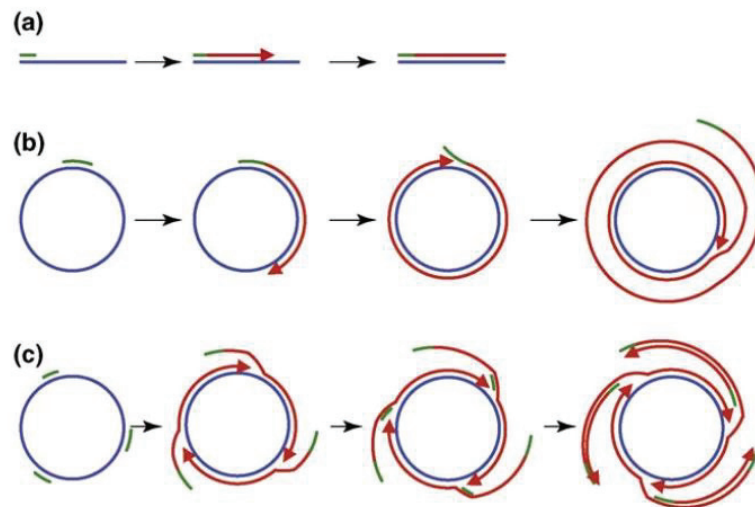


Figure 16 : RCA à multiples amorces pour la détection de génomes circulaires. from Reimar Johné et al, 2009

Les lignes bleues désignent les séquences d'ADN cibles, les lignes vertes représentent les amorces oligonucléotidiques et les lignes rouges représentent le nouvel ADN synthétisé par la polymérase. (a) Modèle linéaire et amorce simple. Après la liaison de l'amorce, la polymérase synthétise un brin complémentaire (b) Matrice circulaire et amorce simple. La polymérase synthétise un brin complémentaire commençant à l'amorce liée. Après un tour, l'amorce et le brin synthétisé sont déplacés et la synthèse de l'ADN se poursuit pour des tours supplémentaires. De ce fait, un long ADN monocaténaire concatémère est produit. (c) Amorces circulaires et matrices multiples. La synthèse est initiée à plusieurs amorces liées au modèle. La synthèse de l'ADN en utilisant le déplacement de brin est effectuée comme dans (b). Cependant, les amorces encore présentes dans le mélange réactionnel se lient au brin déplacé et sont utilisées comme points d'initiation supplémentaires pour la synthèse de l'ADN. Les produits multiples sont de longues molécules concatémères d'ADN double brin.

2.2.2 La méthode d'amplification MALBAC (Multiple Annealing and Looping Based Amplification Cycles)³⁸ (Figure 17)

La méthode MALBAC repose sur l'utilisation de primers spécifiques. Les primers sont composés de séquences de six nucléotides variables s'hybridant aléatoirement sur l'échantillon et sont couplés à une séquence connue de 27 nucléotides. La séquence connue des primers permet de générer des amplicons aux extrémités complémentaires, favorisant la formation d'une boucle. La boucle évite aux brins néo-synthétisés de servir à nouveau de matrice à la PCR et d'engendrer un biais d'amplification (contrairement à la MDA). Ces étapes d'amplifications quasi-linéaires sont répétées cinq fois, puis les amplicons sont amplifiés par PCR exponentielle classique, en amont du séquençage. La MALBAC favorise une meilleure couverture du séquençage avec des biais d'amplification minimale. La quantité d'ADN initiale requise est faible et la polymérase Bst associée à un taux d'erreur de 1/10000 bases.

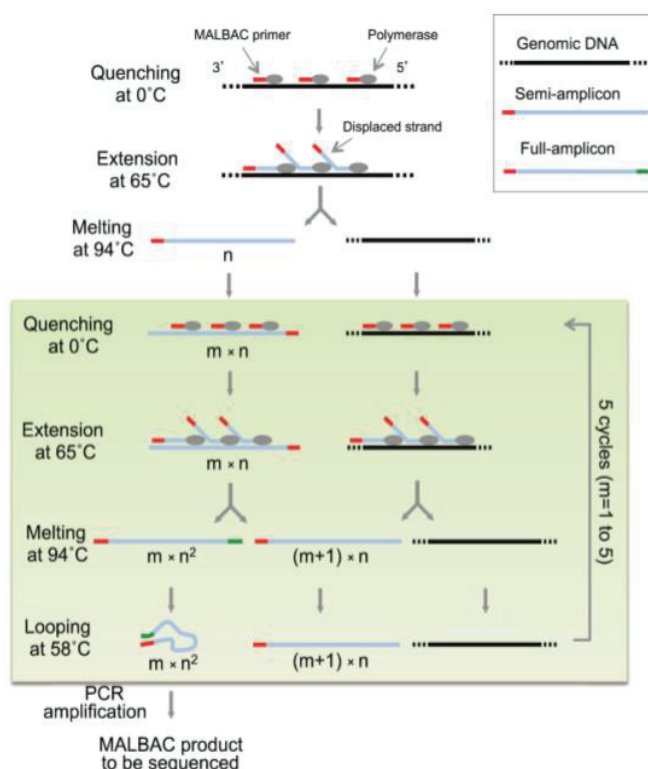


Figure 17 : MALBAC. From Zong et al, 2012

Les primers MALBAC (en rouge) sont composés d'une séquence connue de 27 nucléotides, couplés à une séquence de 6 nucléotides variables qui s'hybrident aléatoirement sur la matrice d'ADN génomique. La synthèse par déplacement de brin génère des semi-amplicons (amplicons partiels) qui subissent une dénaturation à 94 ° C. Dans les cinq cycles de pré-amplification, La fixation de nouvelles amorces sur les semi-amplicons produit des amplicons complets et sur l'ADN génomique produit des semi-amplicons supplémentaires.

Pour les amplicons complets, l'extrémité 3' (en vert) est complémentaire de la séquence de l'extrémité 5' (en rouge). Les deux extrémités s'hybrident formant une boucle, ce qui peut empêcher l'utilisation de l'amplicon complet en tant que matrice, entraînant ainsi la réduction des biais d'amplification et garantissant une amplification presque linéaire.

4.2.2 Les différentes approches de quantification de l'hétéroplasmie de l'ADNmt

Methods	Detection Limit	Variations Type ²	
		SNPs	Indels
Sanger sequencing	~15%	Y	Y
Polymorphism ratio sequencing	~5%	Y	Y
ARMS-qPCR	~0.1%	Y (recorded)	N
Single-molecule PCR	~7% [53]	Y	Y
Digital PCR	~0.01% ¹	Y (recorded)	Y (recorded)
High-Throughput Sequencing	~0.1%	Y	Y

¹ ~1% for deletions. ² we marked Y for yes and N for no. The word 'recorded' represents that this method can only detect the present variations which are recorded in datasets. The absence of 'recorded' means both of the recorded and novel variations can be detected.

Tableau 1 : Comparaison des méthodes de détection de l'hétéroplasmie. Mengqin Duan, 2018

4.2.2.1 Séquençage Sanger :

Méthode abandonnée, principalement à cause de sa faible sensibilité. Le seuil de détection d'hétéroplasmie par le séquençage de Sanger est de 15%.

4.2.2.2 Méthodes basées sur les puces :

Les sondes Oligo-nucléotidiques sont attachées à une surface (micropuce), puis ces sondes s'hybrident aux fragments à détecter. Il existe des puces pour la détection de la variation de l'hétéroplasmie des génomes mitochondriaux comme MitoChip (Affymetrix). Cette puce a une sensibilité de 99,75%, ainsi qu'une précision qui atteint jusqu'à 99,98%. Leur débit élevé et leur faible coût leur permet une application clinique diagnostique.

4.2.2.3 Méthodes basées sur la PCR :

Grâce à quelques changements subtils (fluorochrome et endonucléase, qPCR ... etc.), la PCR permet également la quantification de l'hétéroplasmie, en déterminant le nombre de copies amplifiées, même sur une cellule unique. La PCR a été conçue au début des années 1980 par un chercheur américain, Kary Mullis. Cette technique a révolutionné les approches expérimentales en biologie moléculaire et a largement supplanté les techniques de clonage. La PCR permet l'amplification in vitro d'une séquence d'ADN cible à partir d'un mélange d'acide nucléique. Elle nécessite de connaître la séquence nucléotidique à amplifier pour pouvoir synthétiser un jeu d'amorces ou primers (oligonucléotides correspondants aux bornes

du fragment à amplifier) et de respecter les bonnes pratiques afin d'éviter toute contamination (port des gants, principe de la marche en avant ...etc.).

Toute mise au point d'une réaction PCR nécessite l'optimisation préalable des conditions de la réaction afin de parvenir à l'amplification sélective du fragment recherché. Les éléments essentiels à la réussite d'une réaction d'amplification par PCR sont :

- **Qualité et quantité d'ADN matriciel**

Avant toute analyse, les acides nucléiques doivent être extraits et purifiés. L'extraction est souvent réalisée par des méthodes enzymatiques ou chimiques. La quantité d'ADN de départ influe sur le résultat d'amplification, une quantité insuffisante d'ADN entrainera un rendement faible voire l'échec de l'amplification, alors qu'une quantité trop importante d'ADN peut conduire à la génération de signaux non spécifiques.

- **Qualité et quantité des amorces**

La réaction PCR nécessite l'hybridation d'amorces spécifiques sur la séquence que l'on souhaite amplifier. Cette hybridation spécifique est conditionnée notamment par la qualité et la quantité des amorces utilisées. Les amorces doivent répondre à certaines conditions :

- Le pourcentage de GC doit être autour de 50%.
- Ne doivent pas contenir de motifs répétitifs afin d'éviter l'hybridation non spécifique avec la matrice ni des séquences inversées répétées qui favorise la formation de structures secondaires dans l'amorce (structures « en épingle à cheveu »).
- Ne doivent pas s'hybrider entre elles (auto-hybridation) et former des dimères d'amorces.
- Les températures de fusion des amorces doivent être voisines et de préférences élevées pour éviter le risque d'hybridation non spécifique.
- Les amorces sont utilisées à une concentration de 1µM ; une concentration plus élevée entraine une amplification non spécifique, et une concentration trop faible peut entraver l'amplification.

- **Les tampons de PCR et la concentration en MgCl₂**

Les éléments constitutifs des tampons les plus communément utilisés sont:

- Tris-HCl pH 8,3 : Il tamponne le milieu réactionnel pour optimiser l'activité de la Taq DNA polymérase.
- MgCl₂: L'ion Mg²⁺ est un cofacteur essentiel de la Taq Polymérase. Il tamponne aussi les charges négatives de l'ADN, diminuant ainsi la force de répulsion entre les brins

d'ADN et les primers, favorisant ainsi la stabilité de l'hybridation. Une trop forte concentration peut conduire à une hybridation non spécifique.

- KCl ou $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$: K^+ et NH_4^+ sont des cations monovalents capables d'interagir avec les charges négatives de l'ADN de la même manière que le Mg^{2+} .

- La température d'hybridation

Les températures de dénaturation et de polymérisation sont fixes, seule la température d'hybridation devra être calculée pour chaque nouvelle PCR. Cette température d'hybridation dépend de la séquence en bases des oligonucléotides amorces. Elle est légèrement inférieure (environ de 5°C) au T_m (melting temperature) qui est la température de demi-dénaturation (T_m = la température à laquelle la moitié des molécules d'ADN sont dénaturées).

Si le T_m est différent pour les deux amorces, il faudra prendre le T_m le plus bas comme point de référence. En cas d'amplifications non spécifiques, il faut augmenter la température d'hybridation par paliers de 2°C . L'utilisation combinée des ions monovalents K^+ et NH_4^+ permet d'atténuer l'incidence de la température sur la spécificité de l'amplification, en facilitant l'hybridation et en permettant l'utilisation simultanée d'amorces de T_m différents (PCR multiplex).

À forte température, l'ADN est susceptible d'être altéré et peut subir des cassures en raison du haut niveau énergétique et de la structure simple brin qu'il adopte. De plus lors de l'étape de dénaturation, l'augmentation de la température à 95°C provoque la diminution du pH du milieu réactionnel. Cette acidification est responsable de la dépurination des matrices : la dépurination est une altération de l'ADN, une cassure de la liaison entre une purine (adénine ou guanine) et le désoxyribose auquel elle est attachée^{39,40}. Pour pallier ces effets, le pH du milieu réactionnel est augmenté à 9,1 pour assurer une neutralité à haute température. L'utilisation d'adjuvants de type DMSO, glycérol, BSA et Tween-20 facilite la rupture des liaisons hydrogènes. Ceci permet d'une part de réduire la durée de la phase de dénaturation à quelques secondes (15 à 20 secondes) et d'autre part de dénaturer plus facilement les matrices d'ADN riches en bases GC, optimisant ainsi la PCR. Cependant à forte dose, ces adjuvants peuvent inhiber la Taq Polymérase d'où la nécessité d'adapter la concentration de ces adjuvant et de celle de l'enzyme Taq ou de favoriser les adjuvants qui ne présentent pas d'effet inhibiteur sur l'enzyme Taq.

- La Taq Polymérase

C'est une ADN polymérase ADN dépendante possédant une activité exonucléase ($5'-3'$) mais sans activité correctrice ($3'-5'$). Elle est moins fidèle que l'ADN polymérase I. La

thermorésistance de cette enzyme lui permet d'assurer l'élongation du brin complémentaire à une température optimale comprise entre 70°et 75°C. La Taq polymérase peut-être inhibée par plusieurs substances (inhibiteurs potentiels de la PCR) telles que : hémoglobine, immunoglobine G, lactoferrine, hème, SDS, phénol, etc. Ces inhibiteurs proviennent soit de l'échantillon, soit des réactifs utilisés dans les protocoles d'extraction et de conservation.

La processivité d'une enzyme correspond à l'activité polymérasique 5'→3'. Lors de l'étape d'élongation des amorces, chaque molécule d'ADN polymérase catalyse l'addition d'un nombre variable de résidus nucléosidiques à l'extrémité 3' du brin d'ADN avant qu'elle ne quitte le complexe de polymérisation. Ce nombre varie de 10 à plusieurs milliers de résidus (ex : ADN polymérase III, enzyme assurant la réplication des génomes procaryotes).

La vitesse d'extension de l'ADN polymérase correspond au nombre de nucléotides incorporés par unité de temps. Dans les conditions optimales, elle est de 60 nucléotides/seconde pour la Taq ADN polymérase. Cette vitesse dépend, entre autres, de la présence d'une activité exonucléasique 5'→3'(exo+) et 3'→5' de correction du dernier nucléotide incorporé (proofreading). Le proofreading améliore la fidélité de l'amplification mais ralentit la vitesse de synthèse, diminuant ainsi la vitesse d'extension et la processivité. Des enzymes sans proofreading (exo-) sont utilisées actuellement en PCR pour permettre une extension d'amorce rapide au prix d'une fidélité réduite.

4.2.2.3.1 Cinétique de la PCR et PCR quantitative

La réaction de PCR se déroule selon trois étapes cycliques :

- La dénaturation : s'effectue à une température élevée (94°C), les liaisons hydrogènes reliant les 2 brins sont rompues par la chaleur et l'ADN double-brin devient un ADN simple-brin.
- L'hybridation des amorces : s'effectue à la température d'hybridation. Durant cette étape les amorces se lient à la matrice.
- L'élongation : s'effectue à une température de 72°C. Lors de cette phase la Taq polymérase incorpore les désoxynucléotides complémentaires du brin d'ADN matrice dans le sens 5'→3'

La PCR est un processus d'amplification exponentiel de l'ADN, l'évolution de cette amplification peut être représentée par une courbe sigmoïde, qui peut être elle-même divisée en plusieurs phases (Figure 18) :

Phase d'initiation

- 1) Bruit de fond de la fluorescence aspécifique
- 2) Zone où la mesure de fluorescence est biaisée par le bruit de fond

Phase exponentielle

- 3) Zone de la cinétique en phase exponentielle et mesurable sans biais

Phase de plateau ou phase stationnaire au cours de laquelle il n'y a plus d'amplification.

- 4) Zone de la cinétique où la polymérase devient un facteur limitant
- 5) Phases d'amortissement puis de plateau, elles sont dues à l'apparition de facteurs limitants : l'épuisement des substrats (amorces, dNTP, etc), l'inactivation thermique progressive de l'ADN polymérase, effet inhibiteur sur la Taq par certains produits de la réaction d'amplification (pyrophosphate)

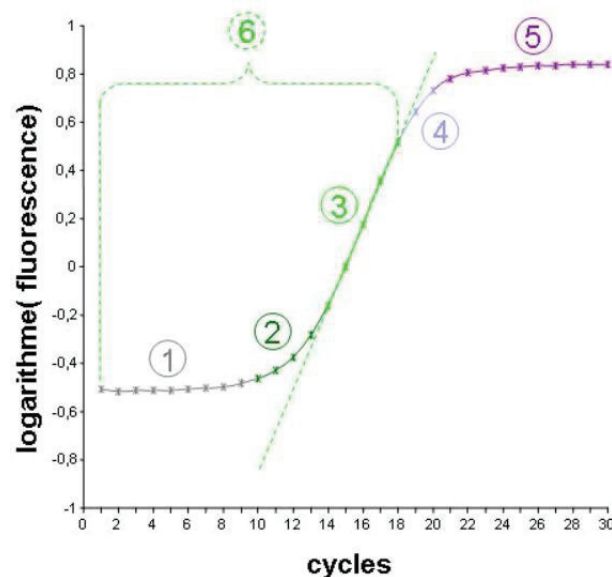


Figure 18 : Cinétique de PCR converties en logarithme décimal. From wikipedia
La cinétique de type exponentiel apparait sous forme d'un segment de droite (segment quantifiable).

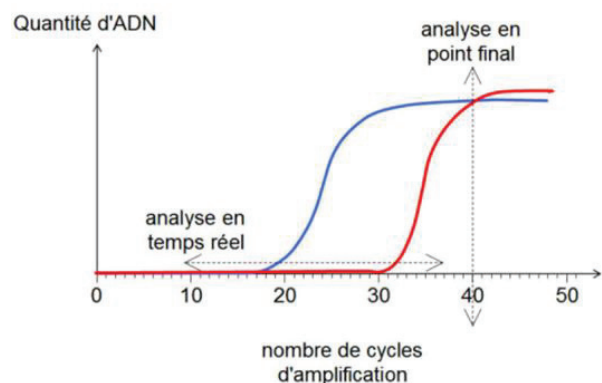
L'analyse du résultat lors de la phase plateau à la fin du processus d'amplification, ce qu'on appelle une analyse en point final, n'est pas quantitative (Figure 19). L'analyse du résultat de la PCR à 40 cycles objective des quantités d'ADN amplifiées similaires pour tous les échantillons. Or la concentration initiale de ces deux échantillons est très différente. Une

vingtaine de cycles de PCR sont nécessaires pour pouvoir détecter des quantités significatives d'ADN dans l'échantillon bleu, alors qu'il faut plus de 30 cycles pour obtenir le même résultat à partir de l'échantillon rouge. Cela signifie que la concentration de départ de l'échantillon bleu est beaucoup plus importante que celle de l'échantillon rouge.

Pour suivre l'amplification en temps réel, il est nécessaire de déterminer la quantité d'ADN produite par la réaction de PCR à la fin de chaque cycle : il s'agit de la PCR quantitative (qPCR). L'utilisation de marqueurs fluorescents permet de mesurer la quantité en temps réel. Plusieurs techniques existent pour faire une qPCR, à titre d'exemple SYBR Green, sonde d'hybridation ou d'hydrolyse.

L'analyse en point final n'est donc pas appropriée pour déterminer la quantité d'ADN dans un échantillon. Si on veut utiliser la PCR comme méthode de quantification, il est nécessaire d'analyser le processus d'amplification de l'ADN lorsqu'il se trouve dans la phase exponentielle. Celle-ci est déterminée grâce à une gamme de cycles, permettant ainsi de faire une mesure quantitative de l'ADN initial à ce niveau.

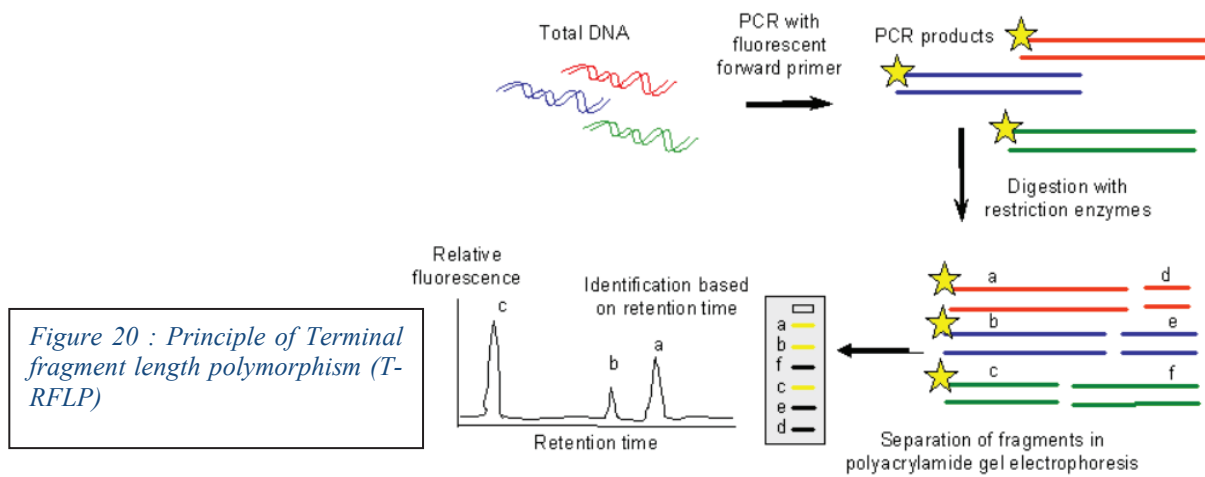
Figure 19 : PCR, analyse en point final



4.2.2.3.2 PCR-RFLP fluorescente

La PCR-RFLP fluorescente est une technique utilisée dans l'analyse de fragments : une PCR avec une amorce marquée par fluorescence est désignée pour amplifier le fragment que l'on veut étudier. Dans le mélange de produit d'amplification on trouve des séquences sauvages et des séquences mutées. La mutation crée ou abolit un site de restriction au niveau de ce fragment. Ensuite, les produits d'amplification sont digérés par l'enzyme de restriction puis analysés par électrophorèse capillaire. Lors de l'analyse, La taille des fragments peut être déterminée avec précision à l'aide d'étalons internes (standard de taille) marqué avec un fluorochrome différent. L'étude des différents profils de migration des produits d'amplification digérés permet de séparer, de détecter et de quantifier les polymorphismes (Figure 20). La quantification se fait en mesurant l'aire sous la courbe des pics de fluorescence. Cette technique est sensible aux biais communs à toutes les techniques d'analyse

basées sur la PCR. La méthode n'est que semi-quantitative en raison de la variation du nombre de copies d'ADN. La limite inférieure fiable de détection des produits de PCR dans un mélange est d'environ 1%.



4.2.2.3.3 Amplification Refractory Mutation System Quantitative PCR (ARMS-qPCR)

C'est une PCR en temps réel avec un ensemble de trois amorces, amorce reverse commune (bleue) et deux amorces directes spécifiques à l'allèle (AS) (orange et verte) (Figure 21). La dernière base des amorces AS est désignée pour être compatible avec les bases altérées ou sauvage (orange G, vert A), tandis que les deux nucléotides immédiatement en 5' du site muté (marqué en rouge) sont également modifiés pour augmenter le pouvoir de résolution des ARMS. Cette dernière modification augmente la limite de détection des variations à 0,1%⁴¹. Cette très grande sensibilité rend la différenciation entre artefacts de PCR et mutations authentiques de l'ADNmt impossible.

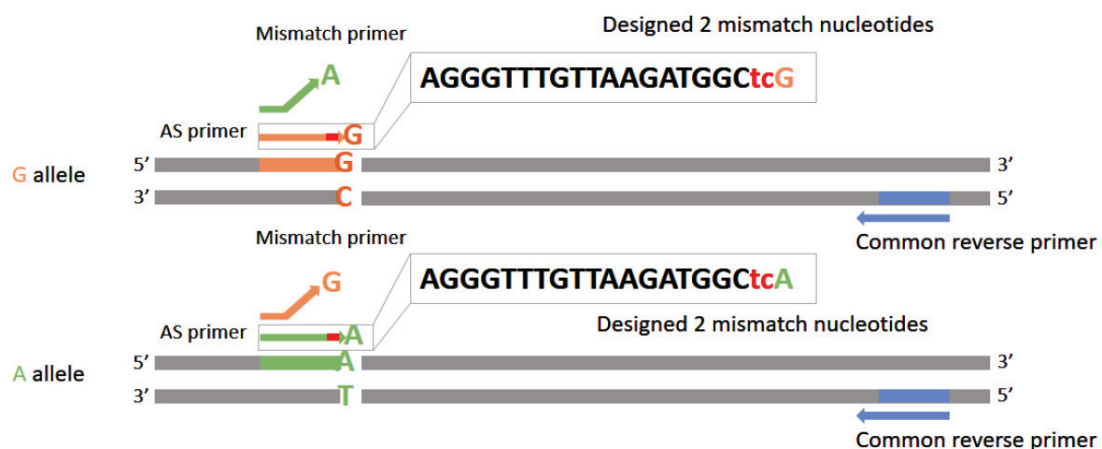


Figure 21: ARMS-qPCR. Mengqin Duan, 2018

4.2.2.3.4 Single-molecule PCR (smPCR)

La Taq polymérase introduit des erreurs lors de l'amplification de l'ADN, la smPCR a été conçue par Sykes *et al*, (1992) pour minimiser ces artefacts. Elle sépare les molécules d'ADN mutées et sauvages avant l'amplification. Sous certaines conditions de dilution (la dilution limite), chaque partition contient, au plus, une molécule d'ADN cible. L'analyse individuelle de la distribution des mutations à la fin de l'amplification permet ainsi d'indiquer si la mutation était présente dans le mélange avant le début de la PCR ou si cette mutation est introduite par la Taq polymérase lors de la réplication.

4.2.2.3.5 Digital PCR (dPCR) ou la PCR digitale

Basée sur la smPCR, cette technique permet l'amplification de molécules d'ADN uniques dans des compartiments indépendants (microplaque ou systèmes microfluidiques) et une détection automatisable des signaux de fluorescence. En calculant le rapport du nombre de puits émettant chaque couleur, il devient possible de quantifier la fraction d'ADN muté contenue dans l'échantillon sans avoir besoin de se référer à une courbe de calibration. La sensibilité de la dPCR dépend principalement du volume d'échantillon et du nombre total de compartiments que l'on peut analyser. La compartimentation à base de microchambres ou de microgouttelettes est plus sensible, plus économique et présente moins de contraintes techniques que les microplaques (Figure 22). L'utilisation d'une compartimentation de gènes et des réactifs de PCR dans une émulsion d'eau (gouttelettes aqueuses) ou dans de l'huile a permis d'augmenter le nombre de compartiment (théoriquement illimité) qui dépend du volume des gouttelettes et de l'échantillon⁴². En plus de sa grande sensibilité (~0.01%) pour la détection des variants, la dPCR a une très bonne sensibilité de détection des délétions de l'ADNmt⁴³.

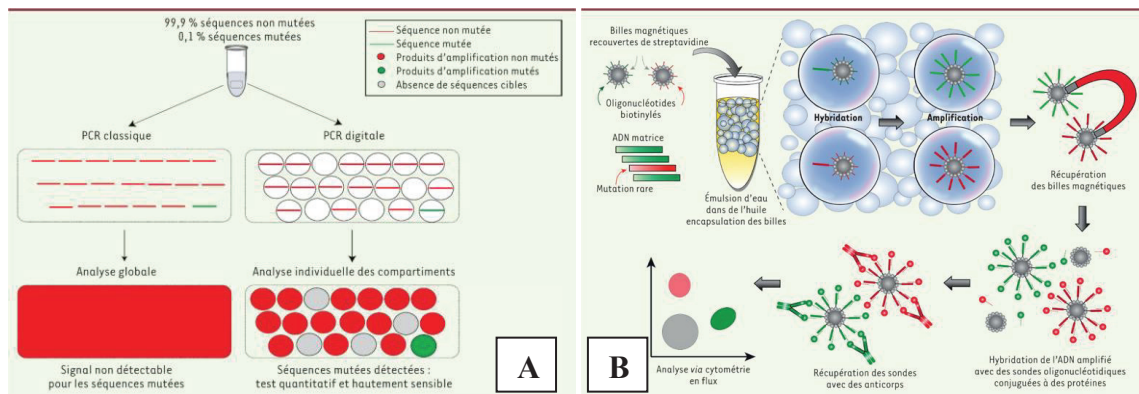


Figure 22 : PCR digitale. Valérie Taly, 2012

A- Comparaison entre PCR classique et PCR digitale sur plaque de microtitration

B- La technique BEAMing : chaque goutte peut soit contenir un ADN matrice fixé sur une bille, soit ne contenir aucun matériel.

4.2.2.4 Méthodes basées sur les technologies de séquençage de nouvelle génération (Next Generation Sequencing ou NGS)

Le méthode NGS génère de nombreuses lectures indépendantes pour chaque fragment de l'ADNmt, permettant ainsi la quantification de l'hétéroplasmie. Cependant, certaines plateformes de NGS possèdent des caractéristiques qui provoquent des erreurs systématiques et faussent ainsi la quantification. Les erreurs de séquençage, les erreurs d'assemblage et les artefacts de PCR ainsi que les autres limitations de la PCR génèrent de faux positifs. Le taux d'erreur des plateformes classiques est estimé entre 10^{-2} à 10^{-3} par appel de base. Ces erreurs de séquençage perturberont l'identification des mutations authentiques de l'ADNmt essentiellement quand le taux d'hétéroplasmie est bas.

Il existe plusieurs stratégies de préparation de bibliothèques (library) pour accroître la précision des plateformes NGS, telles que la méthode de codage à barres moléculaire et de séquençage circulaire par consensus ou encore le séquençage en duplex (duplex sequencing). Le duplex sequencing (Figure 23) détecte les mutations avec des fréquences très faible (5×10^{-8}), une précision très élevée (10 000 fois supérieure par rapport aux méthodes de séquençage classique) et un taux d'erreur bas. Cette méthode est basée sur l'utilisation des étiquettes moléculaires et des adaptateurs de séquençage pour le marquage aléatoire de l'ADN double brin afin de reconnaître les lectures provenant de chaque brin d'ADN. La probabilité que deux erreurs complémentaires se produisent au même endroit exactement sur les deux brins est extrêmement faible. Les lectures générées seront analysées selon deux méthodes: l'assemblage de séquences consensus à brin unique (SSCS) et l'assemblage de séquences consensus duplex (DCS) afin de confirmer uniquement les variants présents dans les deux brins d'ADN.

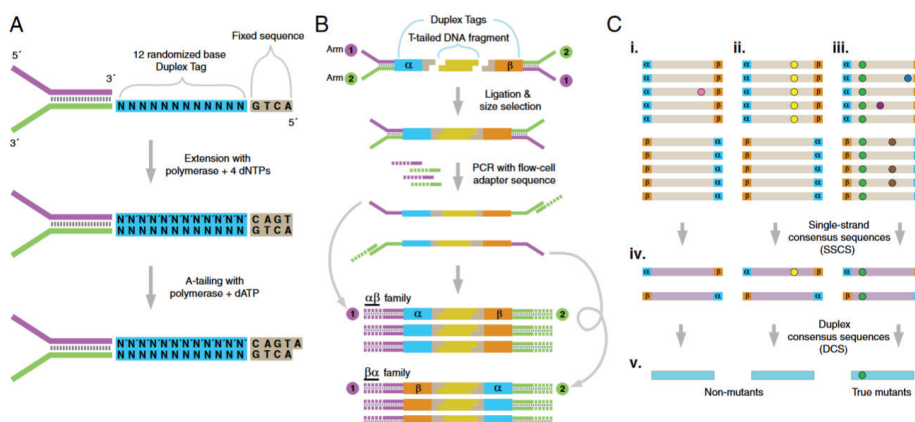


Figure 23 : Vue d'ensemble du séquençage en duplex, Michael W. Schmitt 2012
 A. Synthèse de l'adaptateur.
 B. Flux de travail du séquençage en duplex
 C. Correction d'erreur

4.3 Maladies mitochondriales

Les maladies mitochondriales (MM) sont parmi les plus fréquentes des maladies métaboliques. De nombreuses maladies impliquant un dysfonctionnement mitochondrial ont été identifiées, avec des variations impactant le génome mitochondrial ou nucléaire, touchant directement les gènes importants dans la production d'énergie ou altérant le maintien de l'ADNmt. Le double contrôle génétique mitochondrial et nucléaire rend ces pathologies très hétéroclites avec une très grande hétérogénéité clinique. Les MM peuvent toucher n'importe quels tissus et leur diagnostic est suspecté devant l'association illégitime de symptômes cliniques (Figure 24). Elles peuvent s'observer à tout âge et se transmettre par tous les modes de transmission : maternel, sporadique, récessif, dominant ou lié à l'X.

Atteintes	
Neurologique	<ul style="list-style-type: none">- Hypotonie et grande acidose lactique néonatale (décès avant 1 an)- Encéphalomyopathie nécrosante subaiguë (début souvent avant 1 an)- Encéphalopathie épisodique, régression psychomotrice, retard mental, démence- Épilepsie, souvent pharmacorésistante, état de mal, myoclonies- Pseudo-accidents vasculaires- Syndrome extrapyramidal et mouvements anormaux- Myopathie, ptosis et/ou ophtalmoplégie externe, rhabdomyolyse, myalgie, fatigabilité- Ataxie cérébelleuse, neuropathie, dysautonomie, atteinte médullaire, migraine, etc.
Sensorielle	<ul style="list-style-type: none">- Atrophie optique, rétinite pigmentaire, dystrophie maculaire- Hypoacousie
Cardiaque	<ul style="list-style-type: none">- Cardiomyopathie (plus souvent hypertrophique que dilatée), bloc de conduction
Digestive	<ul style="list-style-type: none">- Insuffisance hépatique ou hépatocellulaire (néonatale), stéatose, cirrhose- Insuffisance pancréatique exocrine- Vomissements, diarrhée, pseudo-obstruction intestinale chronique (à l'adolescence)
Rénale	<ul style="list-style-type: none">- Tubulopathie proximale (néonatale), néphropathie tubulo-interstitielle (plus rare)
Hématologique	<ul style="list-style-type: none">- Anémie sidérolastique, thrombopénie, neutropénie
Endocrinienne	<ul style="list-style-type: none">- Retard de croissance intra-utérin, retard staturo-pondéral- Diabète, hypoglycémie, hypoparathyroïdisme, hyperaldostéronisme

Figure 24 : Signes cliniques observés dans les maladies mitochondriales. By A. Chaussenot

4.3.1 Maladies mitochondriales secondaires à une mutation de l'ADNmt

Le taux de mutations de l'ADNmt est 10 à 20 fois plus élevé que celui observé dans le génome nucléaire⁴⁴. Une étude dans la population générale a montré que, sur les 10 mutations ponctuelles pathogènes d'ADNmt les plus courantes, un individu sur 200 en bonne santé, porte à de faibles niveaux d'hétéroplasmie l'une de ces mutations pathogènes⁴⁵. L'amélioration sensible de la détection des mutations d'ADNmt soulève des questions sur la fréquence réelle des mutations d'ADNmt potentiellement pathogènes chez l'homme, sur la pathogenèse de ces mutations et sur les mécanismes qui contrôlent et modulent l'hétéroplasmie.

Des centaines de mutations ponctuelles différentes et de délétions d'ADNmt ont été associées à une vaste gamme de maladies qui se chevauchent cliniquement. Ces troubles peuvent se manifester de la naissance jusqu'au troisième âge^{46,47}. Malgré la grande hétérogénéité clinique des maladies mitochondriales, certains phénotypes, symptômes cliniques et paracliniques, orientent vers des syndromes qui sont liés à des mutations bien connues de l'ADNmt (Figure 25). Deux patients porteurs de variants pathogéniques identiques peuvent présenter un tableau clinique différent. Il n'y a pas de corrélation phénotype/génotype. Cette hétérogénéité clinique observée dans les maladies mitochondriales est due à plusieurs facteurs, entre autres le taux d'hétéroplasmie. Des études *in vitro* ont montré que le taux d'hétéroplasmie doit dépasser un seuil critique (généralement de 60 à 80%) avant que le défaut biochimique et que les symptômes cliniques ne puissent être détectés. Le seuil varie en fonction des mutations et des tissus/organes (certains organes sont plus vulnérables que d'autres).

Les mutations homoplasmiques de l'ADNmt sont généralement à l'origine d'un défaut biochimique relativement bénin qui affecte souvent un seul organe ou un seul tissu (par exemple, les neuropathies optiques de Leber ou certaines surdités). Cependant, il existe des exceptions dans lesquelles les mutations homoplasmiques ont provoqué des maladies multisystémiques graves⁴⁸.

En revanche, les mutations hétéroplasmiques sont multisystémiques, les organes les plus touchés étant ceux qui ont une forte demande énergétique comme le système nerveux central et périphérique, les muscles, le cœur et les glandes endocriniennes. Il y a une corrélation entre le niveau d'hétéroplasmie, la sévérité clinique et le défaut biochimique des tissus affectés⁴⁶.

Les variants de l'ADNmt peuvent agir comme des maladies monogéniques ou peuvent fonctionner comme un allèle de risque pour les maladies complexes courantes. Des preuves suggèrent que des facteurs environnementaux et épistatiques, l'interaction existant entre deux ou plusieurs gènes, pourraient influencer sur la manifestation et la pénétrance clinique de ces troubles, en particulier pour les mutations homoplasmiques d'ADNmt (Figure 26).

Les très rares mutations hautement pénétrantes de l'ADNmt sont la principale cause de troubles héréditaires mitochondriaux. On distingue :

- Les mutations ponctuelles :
 - Dans des ARN de transfert comme la mutation m.3243A>G (tRNA^{leu}) responsable notamment de l'encéphalomyopathie mitochondriale avec acidose lactique et accident vasculaire cérébral like (MELAS) ou la mutation

m.8344A>G (tRNA^{lys}) responsable de l'ataxie myoclonique et épilepsie avec ragged red fibres (MERRF)

- Dans des sous unités protéiques comme la m.8993T>C (ATPase6 p.L156P) / m.8993T>G ATPase6 (p.L156R) responsable du syndrome de Leigh ou syndrome NARP en fonction du taux d'hétéroplasmie.
- Les délétions de l'ADNmt : responsables principalement du syndrome de Kearns-Sayre et du syndrome de Pearson. Les délétions sont de taille et de position variables, la plus fréquente est une délétion de 4 977 pb emportant différents gènes⁴⁶ (Figure 25). Elles sont retrouvées à l'état hétéroplasmique dans le tissu musculaire dans le syndrome de Kearns Sayre mais sont à l'état homoplasmique dans tous les tissus dans le syndrome de Pearson. Elles n'affectent généralement qu'une génération.

À contrario, les polymorphismes ont un faible effet sur le développement des maladies humaines communes, comme en témoignent plusieurs grandes études qui ont démontré l'impact des polymorphismes d'ADNmt sur la pathogenèse de la maladie de Parkinson²⁹. Certains variants responsables de la neuropathie optique héréditaire de Leber (LHON) ne causent la maladie que s'ils sont associés à d'autres facteurs génétiques ou environnementaux. La pénétrance de ces variants est influencée par l'haplotype mitochondrial et nucléaire et par des facteurs environnementaux tels que le tabagisme^{49,50}.

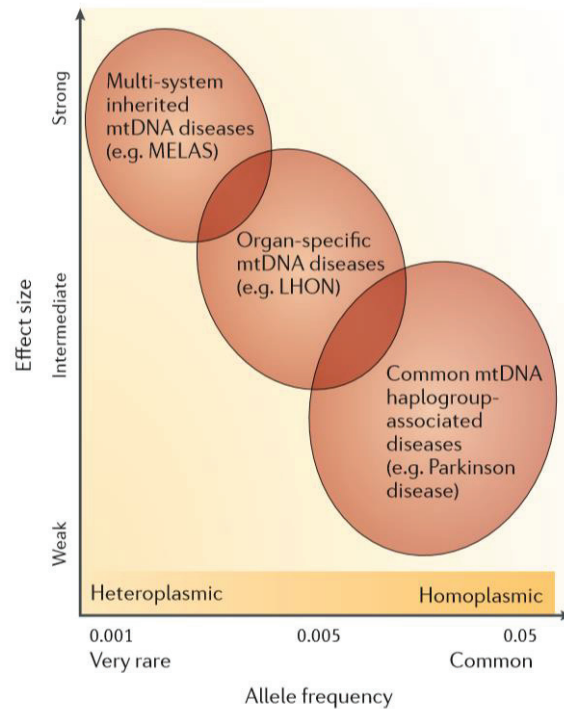
Parallèlement, il a été démontré que les mutations somatiques de l'ADNmt s'accumulent avec l'âge. Cette accumulation touche préférentiellement les organes impliqués dans les maladies communes d'apparition tardive comme les maladies neurodégénératives¹⁹

Syndromes	Principales caractéristiques cliniques	Autres signes	Anomalies de l'ADNmt Transmission
Syndrome de Pearson	Anémie sidéroblastique réfractaire, insuffisance pancréatique exocrine	Atteinte rénale, hépatique et neurologique Acidose métabolique	Délétion unique Sporadique en général
Syndrome de Kearns-Sayre	PEO avec myopathie, rétinite pigmentaire, surdité, ataxie cérébelleuse, bloc de conduction cardiaque	Diabète sucré, démence, dysphagie Protéïnurie > 1g/l	Délétion unique Sporadique en général
Syndrome de Leigh	Encéphalopathie subaiguë avec régression psychomotrice, débutant en général avant 1 an et évoluant par poussées	Acidose lactique Lésions des NGC ou du tronc cérébral à l'IRM	m.8993T > G/C Maternelle
NARP (neuropathie ataxiante et rétinite pigmentaire)	Neuropathie sensitivo-motrice périphérique, ataxie proprioceptive et cérébelleuse, rétinite pigmentaire	Lésion des NGC à l'IRM Rétinopathie à l'ERG et neuropathie à l'EMG	m.8993T > G/C Maternelle
MELAS (encéphalomyopathie mitochondriale, acidose lactique et pseudo-stroke [ou pseudo-AVC])	Épisodes de pseudo-AVC, épilepsie, démence, myopathie, ataxie cérébelleuse, surdité, rétinite pigmentaire, cardiomyopathie (plutôt hypertrophique → dilatée), diabète	Acidose lactique Lésions de pseudo-AVC à l'IRM	m.3243A > G, m.3271T > C Maternelle
MERRF (épilepsie myoclonique avec fibres ragged-red)	Épilepsie myoclonique, ataxie cérébelleuse, myopathie, surdité, atrophie optique	Neuropathie, démence, lipomes multiples Fibres ragged-red à la biopsie musculaire	m.8344A > G, m.8356T > C Maternelle
LHON (neuropathie optique héréditaire de Leber)	Baisse d'acuité visuelle subaiguë bilatérale et indolore Atteinte masculine majoritaire	Neurologiques (dystonie, paraparésie, etc.) Syndrome de Wolff-Parkinson-White	m.11778G > A, m.3460G > A, m.14484T > C, Maternelle

EMG : électromyogramme ; ERG : électrorétinogramme ; NGC : noyaux gris centraux ; PEO : ophtalmologie externe progressive.

Figure 25 : les principaux syndromes liés à des mutations de l'ADNmt. By A. Chaussonot, 2012

Figure 26 : The range of mtDNA variation and its influence on human disease from Stewart and Chinnery 2015



4.3.2 Maladies mitochondriales secondaires à une mutation de l'ADN nucléaire

La majorité des protéines mitochondriales, dont le nombre total est actuellement estimé à plus de 1500¹⁷, sont transcrites à partir de gènes nucléaires et sont traduites dans le cytosol avant leur transfert à travers la membrane mitochondriale. La majorité des maladies mitochondriales sont donc secondaires à des mutations de gènes nucléaires. Les gènes de structures, codant des sous unités protéiques des complexes de la chaîne respiratoire (CR), ont été associés à des tableaux souvent multisystémiques, sévères et précoces. Les gènes d'assemblage, codant des protéines impliquées dans l'assemblage et le maintien des complexes de la CR, ont aussi été observés dans des atteintes multiviscérales ou neurologiques sévères. Les gènes impliqués dans la traduction mitochondriale appartiennent à trois classes fonctionnelles : les protéines des mitoribosomes, la maturation des ARNt mitochondriaux et les facteurs d'élongation et de terminaison. D'autres gènes sont impliqués dans la biogenèse mitochondriale (enzymes antioxydantes, chaperons, transporteurs, ... etc.). Les gènes impliqués dans le métabolisme de l'ADNmt participent soit à la réplication et à la réparation de l'ADNmt soit à la régulation du pool mitochondrial de nucléotides.

4.3.3 Stratégie diagnostique

Le diagnostic des MM est difficile du fait de la grande hétérogénéité clinique rencontrée, il nécessite une stratégie particulière. Il existe plusieurs publications qui ont essayé d'établir des

scores en faveur d'une pathologie mitochondriale⁵¹. Les signes typiquement évocateurs d'une maladie mitochondriale sont :

- Métaboliques : hyperlactatémie ($> 2.5\text{mM}$), élévation du rapport lactate/pyruvate (>20) et des corps cétoniques (3-hydroxybutyrate/acétylacétate >3) ... etc.
- IRM cérébrale : atteintes bilatérales et symétriques ou calcification des noyaux gris centraux, atteinte diffuse de la substance blanche à type de leucodystrophie, pseudo-AVC, présence d'un pic de lactate en spectro-IRM.
- Histologie de la biopsie musculaire : la présence de RRF, fibres COX (-), surcharge lipidique, agrégats mitochondriaux sous-sarolemiques.
- Biochimie de la chaîne respiratoire : déficit de la chaîne respiratoire en polarographie (consommation d'oxygène) et/ou en spectrophotométrie (activité enzymatique des complexes), défaut d'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire (profil BN-PAGE).

La présentation clinique et paraclinique et le mode de transmission peuvent permettre d'orienter les explorations génétiques sur l'ADNmt ou nucléaire. Par exemple la présence de délétions multiples ou d'une déplétion orientent les analyses sur les gènes nucléaires impliqués dans la stabilité de l'ADNmt. A l'opposé, la présence d'une délétion unique de l'ADNmt oriente vers le syndrome de Kearns-Sayre ou Pearson.

Devant la présence d'arguments cliniques et paracliniques évocateurs d'un syndrome particulier, on peut réaliser une recherche ciblée de la mutation/délétion. En l'absence de syndrome particulier évoqué, le screening de l'ADNmt est une étape indispensable, réalisé par séquençage haut débit. Le panel de gènes nucléaires peut être proposé en deuxième lieu si le screening de l'ADNmt est négatif ou d'emblée si le tableau clinique et paraclinique est évocateur d'une atteinte nucléaire.

4.3.4 Classification des variants de l'ADNmt

L'étude exhaustive de l'ADNmt par séquençage haut débit (NGS) est une première étape dans la démarche diagnostique. La mise en place récente de cette nouvelle technologie révolutionnaire a permis d'augmenter fortement le rendement d'identification des mutations. Cependant, en plus de mutations pathogènes connues, le NGS met en évidence de nombreux variants dont la signification est actuellement inconnue. Un enjeu majeur pour obtenir un diagnostic fiable est donc l'interprétation de l'impact clinique de ces nouveaux variants rares, ce qui se révèle très difficile.

Comme les mutations de l'ADN mitochondrial sont beaucoup plus élevées dans la population que ne le sont les mutations de l'ADNn, le génome mitochondrial héberge un grand nombre de modifications de bases neutres ne présentant aucun signe de pathogénicité. L'abondance de polymorphismes neutres nécessite que le rôle pathogène de nouvelles mutations associées à une maladie humaine soit établi au-delà d'un doute raisonnable. Des critères de pathogénicité permettent de classer les variants de bénin à pathogène. Yarham et al ont établi un score de pathogénicité pour les variants touchant les ARN de transfert (Tableau 2). Ce système de notation est basé sur des critères canoniques de pathogénicité, il est essentiellement utile pour décider quelles mutations de mt-ARNt est plus intéressante à étudier par les techniques gold standards qui sont chronophages.

Critères en faveur d'un effet pathogène :

- Fréquence : les variants pathogènes sont rares contrairement aux variants bénins fréquents. Actuellement la base de données la plus utilisée est mitomap⁵².
- Conservation inter-espèce : le changement de base affecte le plus souvent un site conservé au cours de l'évolution et d'importance fonctionnelle.
- Hétéroplasmie / Effet Seuil : c'est un des critères majeurs de pathogénicité. Les mutations délétères sont généralement hétéroplasmiques, bien que quelques mutations pathogènes soient homoplasmiques.
- Une bonne corrélation du taux d'hétéroplasmie avec atteinte tissulaire ou cellulaire est généralement observée. La charge mutationnelle peut atteindre le seuil pathogène dans certains tissus mais pas dans d'autres. De plus, la proportion d'ADNmt muté devrait être plus élevée dans les tissus des individus affectés que dans les mêmes tissus de leurs parents non affectés.
- Transmission maternelle : après la fécondation, l'ADNmt des spermatozoïdes est dégradé ce qui implique que l'ADNmt est hérité de la mère. Par conséquent, une mère portant une mutation de l'ADNmt peut la transmettre à tous ses enfants, mais seule sa fille le transmettra à sa progéniture. Une recherche de la mutation causale peut être réalisée chez les apparentés maternels et en particulier chez la mère du cas index pour confirmer le caractère familial ou de novo de la mutation. L'analyse de la ségrégation de la mutation et de son degré d'hétéroplasmie peut être très informatif pour le conseil génétique et pour déterminer le caractère possiblement délétère du variant de l'ADNmt.

- Les colorations histochimiques des enzymes COX et SDH : présence de fibres déficientes en activité COX ou de RRF.
- Adéquation avec le déficit biochimique : La proportion d'ADNmt muté devrait ségréger avec le défaut biochimique. Plus le taux d'hétéroplasmie est élevé plus le déficit biochimique est marqué.
- Quantification de l'hétéroplasmie sur fibre unique et/ou sur cellules cybrides : elles sont considérées comme le gold standard des investigations et sont indispensables pour classer un variant comme définitivement pathogène.
- Outils de prédictions in silico : MitoTIP est un outil in silico pour prédire la pathogénicité de nouveaux variants d'ARNt mitochondriaux. Il est basé uniquement sur les fréquences dans les bases de données, la nature du changement de nucléotide (transversion / transition / suppression) et le score de conservation. Aucun d'antécédents cliniques, ni de données sur l'hétéroplasmie, ni d'études fonctionnelles ne sont inclus.

Les variants qui touchent les ARN ribosomiques (ARNr) mitochondriaux et les protéines mitochondriales sont actuellement très difficiles à interpréter, nous avons peu d'informations qui permettent de distinguer les modifications pathogènes des polymorphismes. Pour les protéines nous utilisons les outils de prédiction PolyPhen-2 et SIFT qui prédisent l'impact possible d'une substitution d'acides aminés sur la structure et la fonction d'une protéine humaine. Ces outils sont plus adaptés pour les variants nucléaires que mitochondriaux.

Scoring criteria	Score/20		
More than one independent report	Yes	2	Thresholds for the original scoring system (2004): ≤6 points—neutral polymorphisms 7–10 points—possibly pathogenic 11–13 points—probably pathogenic ≥14 points—definitely pathogenic
	No	0	
Evolutionary conservation of the base or base-pair	One change	2	
	Two changes	1	
	Multiple changes	0	
Variant heteroplasmy	Yes	2	
	No	0	
Segregation of the mutation with disease	Yes	2	
	No	0	
Histochemical evidence of mitochondrial disease	Strong evidence	2	
	Weak evidence	1	
	No evidence	0	
Biochemical defect in complexes I, III, or IV	Yes	2	
	No	0	
Evidence of mutation segregation with biochemical defect from single-fiber studies	Yes	3	
	No	0	
Mutant mt-tRNA steady-state level studies Or Evidence of pathogenicity in <i>trans</i> -mitochondrial cybrid studies	Yes	5	
	No	0	

Tableau 2: Le système de notation de la pathogénicité. From John W. Yarham et al.2011

5. Objectif du travail de thèse

Les maladies mitochondriales (MM) sont les plus fréquentes des maladies métaboliques. Ces pathologies étant très hétérogènes sur le plan clinique, seule l'identification de mutation(s) de gène(s) nucléaire(s) ou de l'ADN mitochondrial (ADNmt) permet de confirmer le diagnostic. L'étude exhaustive de l'ADNmt par séquençage haut débit (NGS) est une première étape dans la démarche diagnostique. La mise en place récente de cette nouvelle technologie révolutionnaire a permis d'augmenter fortement le rendement d'identification des mutations. Cependant, en plus de mutations pathogènes connues, le NGS met en évidence de nombreux variants dont la signification est actuellement inconnue. Un enjeu majeur pour obtenir un diagnostic fiable est donc l'interprétation de l'impact clinique de ces nouveaux variants rares, ce qui se révèle très difficile. Le nouveau cheval de bataille des laboratoires experts est donc la mise en place de nouveaux outils d'interprétation. Ce travail de thèse s'inscrit dans cette perspective.

Le but de l'étude est de mettre en place un nouvel outil diagnostique afin de proposer un conseil génétique fiable et une prise en charge adéquate des maladies mitochondriales secondaires à une mutation de l'ADNmt. Une partie de ce travail s'est intégrée dans le protocole de recherche biomédical intitulé « Mise en place d'une technique de quantification d'ADN mitochondrial sur fibre musculaire unique comme outil d'interprétation des variants de signification inconnue dans les maladies mitochondriales » permettant l'inclusion de cinq sujets éligibles atteints de maladies mitochondriales. La caractérisation des variants chez les patients testés permettrait aussi bien de poser un diagnostic définitif que d'orienter la prise en charge thérapeutique et le conseil génétique familial.

L'outil diagnostique repose sur une technique qui consiste en une première étape de microdissection par laser des différentes fibres musculaires suivie d'une deuxième étape de quantification du variant à partir de chaque fibre. Cette deuxième étape nécessite une mise au point spécifique pour chaque variant identifié.

Une PCR-RFLP fluorescente a été mise au point pour chaque variant, le fragment amplifié était compris entre 200 et 400 pb et englobait le variant étudié. Ce dernier crée ou abolit un site spécifique d'une enzyme de restriction, l'introduction de mismatches au niveau des amorces a parfois été nécessaire pour obtenir un site de restriction. Plusieurs conditions de PCR ont été testées pour valider les conditions optimales quantitatives pour chaque variant. Une fois les conditions validées, les produits des PCR fluorescentes sur fibre unique ont été analysés sur l'analyseur de fragments ABI3100 Genetic Analyzer, en utilisant Liz400

(Applied Biosystems) comme marqueur d'alignement, pour s'assurer de la réussite de l'amplification et de la bonne taille du fragment amplifié. Ensuite, Les fragments de réaction d'amplification réussis ont été digérés avec l'enzyme de restriction appropriée et analysés à nouveau avec ABI3100 Genetic Analyzer. Les charges mutationnelles ont été quantifiées à l'aide de GeneMapper (V.4.0) en calculant les surfaces des pics (aire sous la courbe). Cette technique a été appliquée chez les huit patients et les résultats sont décrits dans la publication qui suit. Cet article est en cours de finalisation avant soumission au journal « Human Mutation ».

6. Article

Single-fiber studies for assigning pathogenicity of eight unclassified mitochondrial DNA variants associated with mitochondrial cytopathies phenotypes

Elamine Zereg (1), Annabelle Chaussenot (1), Sylvie Bannwarth (1,2), Godlieve Morel (1), Sabrina SACCONI (3), Marie-Hélène SORIANI (3), Shahram ATTARIAN (4), Aline CANO (5), Jean Pouget (4), Rémi BELLANCE (6), Christine TRANCHANT (7), Samira Saadi Ait-El-Mkadem (1,2), Bernadette Chafino (1), Mathieu Berthet (1), Konstantina Fragaki (1,2), Véronique Paquis-Flucklinger (1,2) Cécile Rouzier (1,2)

(1) Department of Medical Genetics, National Center for Mitochondrial Diseases, Nice Teaching Hospital, Nice, France

(2) IRCAN, UMR CNRS 7284/INSERM U1081/UNS, School of Medicine, Nice Sophia-Antipolis University, Nice, France

(3) Neuromuscular Diseases Centre, Department of Clinical Neurosciences, Nice Teaching Hospital, Nice, France

(4) Referral Center for ALS and Neuromuscular Diseases, Timone University Hospital, Aix-Marseille University, France.

(5) Reference Center for Inherited Metabolic Diseases, Timone Hospital, Marseille, France.

(6) Neuromuscular Reference Center, Fort-de-France Teaching Hospital, Fort de France, France.

(7) Movement Pathology department– Strasbourg Teaching Hospital, Strasbourg, France

(8) Department of Neurology, Gui de Chauliac Hospital, Montpellier University Hospital Center, Montpellier, France.

Adresse du correspondant

Dr. Cécile Rouzier

MD, PhD

Service de génétique Médicale

Laboratoire de Biologie Moléculaire

Centre de Référence des Maladies Mitochondriales

Hôpital L'Archet 2

151 Route St Antoine de Ginestière

06200 Nice

04 92 03 62 43/64 59

rouzier.c@chu-nice.fr

Keywords**mitochondrial tRNA; single-fiber studies; mtDNA; heteroplasmy****ABSTRACT**

Whole mtDNA sequencing is now systematically used in clinical laboratories to screen patients with phenotype suggestive of mitochondrial disorders. NGS has significantly increased the number of pathogenic mtDNA variants identified. In the same time, the number of VUS has increased even more and their interpretation remains challenging. Correct classification of variant pathogenicity is essential for an optimal patient management including treatment and genetic counselling.

Here we describe the characterization, by single-fiber study, of seven heteroplasmic mtDNA variants, including three novel variants. Through the application of the pathogenicity scoring system, we have classified four variants as “definitely pathogenic” (m.590A>G, m.12293G>A, m.15958A>T, m.9166T>C). Two variants remain “possibly pathogenic” (m.5672T>C, m.4327T>C) but a future report of those variants in separate family would be sufficient for reclassification as “definitely pathogenic”. We also illustrate, with one patient, the contribution of single-fiber studies to the diagnostic strategy, in patients with pathogenic variants at low level of heteroplasmy.

Introduction

Mitochondrial disorders affect ~1 in 4,300 of the population⁵³, they are among the most common metabolic diseases⁵³. They are due to mutations that primarily or secondarily lead to OXPHOS dysfunction or other disturbances of mitochondrial structure and function. They display heterogeneous phenotypic and biochemical presentations⁵⁴ and because mitochondria are assembled with proteins encoded in the mitochondrial genome as well as the nuclear genome, these disorders are a combination of Mendelian and maternal inheritance.

Clinical, biochemical, and genetic heterogeneity among individuals, together with poor understanding of gene-to-phenotype relationships, pose significant diagnostic challenges for clinicians. Thus, only the identification of the causative mutation, either mitochondrial DNA or nuclear genes variants, can confirm the diagnosis.

In recent years, mitochondrial disease genetics has been completely transformed by the emergence of next generation sequencing (NGS) technologies which allowed to rapidly increase the genetic diagnostic prevalence of these disorders, from 10% to 20% in the pre-NGS era to more than 50% in some cohort⁵⁴. However, NGS has also led to the identification of an exponential number of variants of unknown significance (VUS). Nevertheless, having information on the disease relevance of the VUS that a patient harbor is critical for obtaining a reliable diagnosis and the care of the patient, therefore classifying VUS becomes an urgent problem.

In adults, the first step of our diagnosis strategy is whole mitochondrial genome sequencing in affected tissues. Mitochondrial DNA (mtDNA) is a circular molecule of 16.569 base pairs, containing 13 protein-encoding genes that are part of the protein complexes I, III, IV, and V of the oxidative phosphorylation system, as well as 22 tRNAs and two rRNAs that contribute to mitochondrial protein synthesis⁵⁵. Mitochondrial DNA genetics is characterised by maternal inheritance and the presence of multiple copies within each cell. Hundreds of putative pathogenic mtDNA variants have been identified⁵⁶. Most of them are heteroplasmic. Heteroplasmy is a condition in which wild type and mutant mitochondria genome co-exist. The degree of heteroplasmy is used to describe the ratio of the mutant mtDNA as compared to the wild type. The degree of heteroplasmy may vary significantly among different tissues in the same subject and influences phenotype.

Actually, the interpretation of sequence variants, identified in genes that cause Mendelian disorders, is based on the ACMG standards and guidelines⁵⁷. Given the differences between mtDNA and nuclear genome, the interpretation of mtDNA variants needs distinct criteria⁵⁸.

Pathogenic criteria include that the degree of heteroplasmy should be higher in clinically affected tissues and should segregate with a biochemical defect⁵⁹. Typically, the emergence of biochemical deficit requires high levels of mutant mtDNA in specific tissue exceeding 60-80%⁶⁰. However, this threshold varies upon the mutation and the tissue⁶¹. Thus, accurate quantification of heteroplasmy is critically important in the diagnosis, treatment and genetic counselling¹⁹. This quantification is performed quite easily in clinical laboratories in tissues such as muscle, liver, blood or fibroblasts. However, these results are often not sufficient to interpret their pathogenicity. A gold standard technique for assigning pathogenicity is single-fiber quantification⁶².

Herein we implemented routine strategy with single-fiber analysis and used it for each variant that wasn't considered as "definitely pathogenic" by the scoring system described by Yarham et al⁶². We characterized seven mtDNA variants which allowed us to confirm definitely the diagnosis in four patients and to bring strong arguments for two others.

Moreover, we raised the question of the interpretation of pathogenic variants, identified at low level of heteroplasmy, and illustrate, with one patient, the contribution of single-fiber studies to the diagnostic strategy in this situation.

Materials and Methods

Patient's cohort and clinical findings

We investigated eight patients with clinical features suggesting a mitochondrial dysfunction. Their characteristics are summarized in (Table 4). There was considerable diversity in the clinical presentations, however, all patients but one had exercise intolerance, two had cerebellar symptoms and two patients had Chronic Progressive External Ophthalmoplegia (CPEO). All patients had the presence of COX deficient fibers and ragged red fibers (RRF) on muscle histological examinations. One patient had a respiratory chain complexes deficit (patient 4) and one had its complex V activity at the low limit of the normal values (patient 8). Long-range PCR of skeletal muscle DNA samples from each of the eight patients excluded the presence of large-scale mtDNA rearrangements except for patient seven who had multiple deletions, confirmed by Southern blot⁶³. Mutation in genes involved in the maintenance of mtDNA integrity, such as *POLG*, were ruled out by sequencing of a targeted mitochondrial panel of 281 nuclear genes involved in mtDNA instability⁶⁴.

For all patients, informed ethical consent was obtained during the diagnostic process through the acquisition of a skeletal muscle biopsy. Additional consent was obtained as part of AOI research project [16-AOIP-04 (promoteur CHU de Nice), N° IDRCB : 2017-A00688-45].

Histological examination and biochemical analyses

All patients had skeletal muscle biopsy which was stained according to cytochrome *c* oxidase (COX) / succinate dehydrogenase (SDH) standard protocols⁸. The activities of the individual respiratory chain complexes and the mitochondrial matrix enzyme citrate synthase (CS) were measured at 37°C on muscle crude homogenates as previously described⁶⁵. For Blue Native-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) analysis, equal amounts (15 µg) of muscle mitochondrial respiratory complexes were separated on a 4–13% acrylamide gradient gel, as previously described⁶⁶. They were then electroblotted onto a polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane prior to incubation with specific antibodies directed against the five respiratory chain (RC) enzymatic complexes⁶⁷.

Molecular genetic analysis

Total DNA was extracted from blood, urine, buccal cells and skeletal muscle according to standard procedure. Whole mtDNA was sequenced on muscle samples as previously described⁶⁸ using the Ion PGM System (Ion Torrent). The data were analysed using Ion Reporter™ software (v5.10). Long-range PCR was performed as previously described⁶⁹. The reference mtDNA sequence used is the revised Cambridge Reference Sequence (rCRS), GenBank number NC_012920.1.

Assessment of mtDNA heteroplasmy

The level of heteroplasmy of variants in tissues and single fibers was determined by fluorescent PCR-RFLP. PCRs were performed using primers listed in (Supp. Table. 1) using 1 mM of each a 6-carboxyfluorescein (FAM)-labelled primer and 2.5 U AmpliTaq polymerase. PCR products were digested with the appropriate restriction enzymes (Supp. Table. 1). Amplification reaction fragments were analysed on an ABI3100 genetic analyser using GeneScan™ -400HD (Thermo Fisher) as an alignment marker. Mutational loads were quantified using GeneMapper (V.4.0) by calculation of peak areas.

Single muscle fiber isolation and sample preparation

Skeletal muscle cryosections (20 μm) were COX / SDH stained on 1 mm PEN-membrane microscope slides (Zeiss). We used laser capture microdissection of COX positive and COX negative single fibres which were subsequently captured in 200 μl caps sterile microtubes using a Zeiss PALM Laser Microbeam system. Digestion of captured single fibres was performed in 20 μL Tris/Tween/Proteinase K lysis buffer (0.5 M Tris-HCl, pH 8.5, 1% Tween 20, 15 μL Proteinase K, pH 8.5) overnight at 65°C followed by inactivation of proteinase at 95 °C for 10 min. 15 μL were used in a standard 50 μL PCR reaction. Single cell fluorescent PCR conditions were : initial denaturation at 95°C for 15min, followed by 35-40 cycles at 95°C for 15s, 54-60°C for 15s, and elongation at 72°C for 30s. A final elongation step was performed at 72°C for 7 min.

Assigning Pathogenicity to Mitochondrial Variants

The pathogenicity of each of the mt-tRNA variants identified in this study, was assigned using the validated scoring system published by Yarham et al⁶². The variants are classified as “definitely pathogenic” if the score ≥ 11 points with evidence from one of the gold standard investigations (segregation of the variant with a biochemical deficiency in single-fibers, high-resolution Northern blotting analysis of mt-tRNA steady-state levels, or transmitochondrial cybrid studies). If the score is ≥ 11 points but lacking evidence from a “gold-standard” investigation, the variants are classified as “probably pathogenic”. The variants are classified “possibly pathogenic” with a score of 7–10 points and “neutral polymorphism” with a score of ≤ 6 points. (Supp. Table. 2). For each mt-tRNA variant, we also applied the predictive MitoTIP scoring for tRNA variants tool⁷⁰.

For variants affecting proteins, we used the same criteria without scoring as this classification has not been validated for these variants. We also used in silico tools to predict structure, function and conservation changes^{71,72}. the conservation index calculation in genes was obtained from the mitomaster database.

Statistical analysis

Student’s t-test statistics were generated using statview (v5.0.0.0).

Results

Identification of mtDNA variants

In each of the 8 patients whole mtDNA genome sequencing revealed one heteroplasmic mtDNA variant possibly responsible of the patient's disease (Figure 27).

Three variants have never been referenced in the literature (m.5672T>C, m.590A>G and m.4327T>C), while 5 variants have been previously published. Three variants, m.12293G>A, m.15958A>T, and m.9166T>C, were previously reported as pathogenic but no single fiber nor trans-mitochondrial cybrid studies were performed to classify them as “definitely pathogenic”^{68,73,74}. Concerning the m.5703G>A, the pathogenicity was clearly established^{75–79} but the low level of heteroplasmy identified in patient five muscle, around 14%, was surprising. Also, we decided to investigate further this patient to clearly prove the implication of this variant in the patient's disease. Finally, one variant, m.4935A>G, was previously reported as a VUS^{80,81}.

Six variants were located in five different mitochondrial tRNA (mt-tRNA) while two variants affected protein-coding genes, *MT-ND2* and *MT-ATP6*. The six mt-tRNA variants were located in a variety of structural stem and loop regions (Figure 29). Using MitoTIP, the m.5703G>A tRNA^{Asn}, was reported as “confirmed pathogenic” and most of the variants were classified as “possibly pathogenic” (m.12293G>A tRNA^{Leu}, m.4327T>C tRNA^{Ile}) or “likely pathogenic” (m.15958A>T tRNA^{Pro}) but two variants were classified as “likely benign” (m.5672 T>C tRNA^{Asn}, m.590A>G tRNA^{Phe}). The ATP6 variant was predicted “probably damaging/deleterious” according to Polyphen2 and SIFT scores respectively, while the ND2 variant was predicted “benign/neutral”. Five variants were at a highly conserved positions, but three variants affected low to moderately conserved positions, including the confirmed pathogenic m.5703G>A.

Mutation Heteroplasmy and Inheritance Patterns

NGS data were confirmed by fluorescent PCR-RFLP in muscle from each patient, whereas blood, urine, fibroblasts, and buccal mucosa were also tested where possible (Figure 27).

An analysis of mutation load in non-invasive tissues (blood, urine, and buccal mucosa) from the mother or maternal relatives, where available, were assessed to determine the inheritance pattern of each variant. Four variants seemed to be *de novo* as they could not be identified in the mothers' samples (Patients 2, 4, 5 and 7). One variant was shown to be maternally

inherited (m.590A>G), however, the mutation load was very low (<5%) in the blood of her asymptomatic mother, and undetectable on blood and urine samples of her sister.

Assessment of mtDNA heteroplasmy in single cells

We performed a single cell heteroplasmy quantification to determine whether the mutation rate in individual COX-positive and COX-deficient fibers correlated with the observed biochemical phenotype. We found significantly higher ($P < 0.05$) heteroplasmic rate in the COX-deficient fibers compared with the COX-positive fibers for 7 variants (m.5672 T>C, m.12293G>A, m.590A>G, m.15958A>T, m.5703G>A, m.4327T>C, m.9166T>C), confirming segregation of the identified mtDNA variants with respiratory chain deficiency in each patient. Six of these patients had mt-tRNA variants and one patient had a *MT-ATP6* variant (m.9166T>C). No statistically significant difference was observed for the one patient harboring the variants, m.4935A>G in the *MT-ND2* gene.

Discussion

Whole mtDNA sequencing is now systematically used in routine diagnosis laboratories to screen patients with phenotype suggestive of mitochondriopathy. NGS has significantly increased the number of identified pathogenic mtDNA variants. In the same time, the number of VUS has increased even more and their interpretation remains challenging. Correct classification of variant pathogenicity is essential for an optimal patient management including treatment and genetic counselling.

Here we describe the characterization of seven heteroplasmic mtDNA variants, including three novel variants. We also illustrate with one patient, the contribution of single-fiber studies to the diagnostic strategy, in patients with pathogenic variants at low level of heteroplasmy.

Classification of novel mtDNA variants

We identified in patients 1, 3 and 6, three novel mt-tRNA variants. All are heteroplasmic and single fiber analysis demonstrated a statistically significant segregation of heteroplasmy level with biochemical deficiency in each patient.

Those results allowed to classify the variant m.590A>G, tRNA^{Phe} (11 points) as “definitely pathogenic”. This novel variant affects the mt-tRNA^{Phe}, already involved in mitochondrial

myopathies and exercise intolerance^{82,83}. It is located in the DHU loop, considered as a variable region⁵⁸, but pathogenic variants have already been described in this loop such as the frequent m.3243A>G in the mt-tRNA^{Leu(UUR)}, responsible for phenotypes from the mild MIDD (Maternally Inherited Diabetes and Deafness) to the severe MELAS syndrome. Our results and the high conservation of this base position suggest its implication in tertiary structure formation of tRNA^{Phe}. tRNA^{Phe} could have a “relaxed” tertiary L-shaped structure, as suggested for mt-tRNA^{Leu(UUR)} which might be particularly vulnerable to an alteration in the base composition of the large DHU loops^{58,84}.

However, despite single-fiber study evidence supporting pathogenicity, the two variants m.5672T>C, tRNA^{Asn} (9 points), and m.4327T>C, tRNA^{Ile} (10 points) have failed to reach the threshold of “definitely pathogenic” score, due to the lack of both evolutionary conservation and respiratory chain deficiency. Subsequently, another independent report of these two variants would be necessary for reclassification as “definitely pathogenic”.

The m.5672 T>C is located in the TΨC loop of tRNA^{Asn}. Like the DHU loop, this region is variable, and few pathogenic variants arise in it. However, pathogenic variants have also been described in this structure like the m.12320A>G in the mt-tRNA^{Leu(CUN)} responsible for a myopathy⁸⁵. Moreover, variants in tRNA^{Asn} are well known to be responsible for CPEO like observed in patient one.

The variant m.4327T>C is located in the acceptor stem of tRNA^{Ile} which is a region considered as a pathogenic variant’s hotspots. Variants affecting this structure might disrupt Watson–Crick base pairing and secondary structure^{58,86}. tRNA^{Ile} is involved in a large spectrum of mitochondrial disorders from mild deafness and CPEO to severe, illustrating the considerable heterogeneity seen in mitochondrial diseases and the limited correlation phenotype–genotype of mt-tRNA mutations.

Classification of previously reported mtDNA variants tRNA variants

We identified in patients 2 and 4, two mt-tRNA variants previously reported as pathogenic, m.12293G>A tRNA^{Leu(CUN)} and m.15958A>T tRNA^{Pro} respectively. However, using the Yarham score, both were classified as “possibly pathogenic” with a score <11 points.

The variant m.12293G>A was reported only once in a patient presenting with an axial myopathy⁷³. The patient developed a progressive scoliosis consisting of decompensated deformity with severe sagittal and coronal plane imbalance. The patient’s mother and son also

had a scoliosis. MtDNA analysis showed multiple mtDNA deletions and a 40.9% heteroplasmic m.12293G>A variant located in the anticodon stem of tRNA^{Leu(CUN)}. The pathogenicity of the variant was assigned on the high conservation of the position and its absence of the patient's blood. Patient 2 presented with a mild myopathy with exercise intolerance and unilateral ptosis beginning in childhood. Level of heteroplasmy was 45% in muscle, and lower in urine, buccal mucosa and blood, 31%, 15% and 14% respectively. The variant was not identified in urine, blood and buccal mucosa of the mother suggesting a *de novo* event. MitoTIP predicted the variant as “likely pathogenic”. Single-fiber analysis allowed to definitely demonstrate the pathogenicity of this variant.

The variant m.15958A>T, was previously reported by our team⁶⁸, in patient 4 who presented with a severe myopathy beginning at 4 years of age . The variant was at very high level of heteroplasmy in muscle (96%) and urine (78%) compare to low levels in buccal mucosa (0%) and blood (14%). The variant was not identified in urine, blood and buccal mucosa of the mother suggesting a *de novo* event. MitoTIP predicted the variant as “likely pathogenic”. However, at that time, we could not perform single-fiber analysis. Finally, we could access to frozen muscle and thanks to single-fiber analysis we can now consider this variant as definitely pathogenic and responsible for the clinical presentation of the patient.

Variants in protein-coding genes

We also identified in patient 7 and 8, two variants in genes encoding mitochondrial proteins, m.4935A>G, p.Thr156Ala (*MT-ND2*) and m.9166T>C, p.Phe214Leu (*MT-ATP6*) respectively.

The m.4935A>G has been identified once in a large cohort but very few informations are available⁸⁷. It was predicted “benign/neutral” according to Polyphen2 and SIFT scores respectively and was classified as variant of unknown signification. ND2 is a subunit of the respiratory chain Complex I that is believed to belong to the minimal assembly of core proteins required to catalyze NADH dehydrogenation and electron transfer to ubiquinone. Classically, pathogenic variants of the *MT-ND2* gene are known to cause mtDNA-associated Leigh syndrome⁸⁸. It has also been reported in patients with LHON⁸⁹ and myopathies associated with complex I deficiency^{90,91}. Patient 7 exhibited an exercise intolerance beginning around 32 years old with peroneal amyotrophy associated with multiple lipomas affecting trunk and limbs. Echocardiography found a hypertrophy of inter-auricular septum without significant hypertrophic cardiomyopathy. Electromyogram was normal. Clinical signs together with histochemical anomalies on muscle (cox- 5%, 2 RRF and subsarcolemmal

mitochondrial aggregates) were suggestive of mitochondrial disorder. However, no complex I deficiency could be identified. Despite the low conservation of the amino acid Phe214 and the *in silico* predictions in favor of a benign substitution, the segregation of the variant with mutation load around 50% in muscle and urine, and lower in fibroblasts, buccal mucosa and blood, and the absence in urine, blood and buccal mucosa of the mother lead us to perform further functional studies. First, we performed BN-PAGE on muscle but did not identify any assembly defect of respiratory chain complexes. Then we performed single-fiber study and did not find a statistically significant segregation of heteroplasmy level with biochemical deficiency in COX-positive and COX-deficient fibers. These results did not allow us to conclude on the pathogenicity of this variant. Despite this, we cannot categorically exclude a pathogenic effect of the m.4935A>G. Indeed, single-fiber studies could not be efficient for variants affecting complex I genes. This variant could be insufficient to cause disease alone but instead it causes pathogenesis associated with environmental or other nuclear variants. Although, the panel analysis of nuclear genes involved in mitochondrial disorders was negative, an exome sequencing could be performed in this patient.

The m.9166T>C has been reported as “possible deleterious” once in a patient presenting with bilateral optic neuropathy and psychiatric manifestations with poor school performance. All *in silico* tools predicted it as deleterious and the position Phe241 was highly conserved. The mutation load was 100% in lymphocytes⁷⁴. *MT-ATP6* encodes the subunit 6 of mitochondrial ATP synthase (complex V). The most frequent *MT-ATP6* variant is the m.8993T>G, responsible for Leigh and NARP syndromes⁹². *MT-ATP6* variants have also been involved in LHON⁶³ or infantile hypertrophic cardiomyopathy⁹³. Patient 8 presented with a mild myopathy beginning around 40 years of age but did not exhibit optic neuropathy or neuropsychiatric disorder. Muscle biopsy revealed a typical mitochondrial myopathy with cox negative fibers, RRF and lipid accumulation. Respiratory chain analysis revealed a complex V activity at the low limit of normal values. BN-PAGE showed a defect of assembly of all complexes of the mitochondrial respiratory chain. Mutation load of the m.9166T>C variant was similar in muscle (60%), urine (55%) and buccal mucosa (59%) and a little lower in blood (45%). It was not found in the brother’s blood. As the segregation of the variant in the different tissues was not obvious, we completed the analysis by single-fiber analysis which confirmed the pathogenic effect of this variant.

Variants at low level of heteroplasmy

Mitochondrial DNA NGS screening lead to the identification of patients with low level mutated DNA which raises the question of the responsibility of those mutated DNA in the patient's disease.

It is difficult to have an exact estimation of the carrier frequency in general population, but Elliott et al. reported that at least one in 200 healthy humans could harbor a pathogenic mtDNA variant⁴⁵. Most pathogenic variants are heteroplasmic and lead to a biochemical defect of the respiratory chain when a critical threshold is exceeded. This threshold varies from mutation to another. From which threshold and in which tissue can we affirm that a pathogenic variant is responsible for the patient's disease?

In patient 5, we identified the m.5703G>A tRNA^{Asn} variant at a level of 14% in muscle. Its pathogenicity was clearly established⁷⁵⁻⁷⁹ but the low level of heteroplasmy was surprising regarding to the percentage of cox negative fibers (20-30%). Due to the low mutation load, segregation in tissues was not significant. The phenotype of patient 5 was similar to the previously patients reported who exhibited early onset CPEO, associated with fatigability and extremely thin appearance^{76,79}, however level of heteroplasmy were >60% in both patients' muscle and much lower in blood. Also, we decided to perform single-fiber study which showed a perfect segregation of mutation load with the biochemical defect. This analysis allowed us to conclude definitely on the responsibility of this variant in the patient's disease. This makes the assessment of overall tissue heteroplasmy rate not accurately enough to reflect the status within affected cells, especially in low heteroplasmy rate level. Analysis of mtDNA variants within single cells is therefore a valuable solution to specify the pathogenicity of the variant in the patient's disease.

Diagnostic implication

Correct classification of reported variants has obvious consequences for helping health care providers to make individualized treatment decision including the choice of medication and genetic counselling. The data presented here highlight the importance to use a common scoring system and the necessity of functional analysis to classify correctly novel identified variants. We used the pathogenicity scoring system described by Yarham et al as it has been validated in a large cohort of 88 mutations⁶². It allowed to classify four variants as "definitely pathogenic" (m.590A>G, m.12293G>A, m.15958A>T, m.9166T>C) with a high confidence degree. However, despite the fact that the Yarham scoring system is an updated version of the

original scoring system of McFarland et al.⁵⁸ which use adjusted threshold in order to increase sensitivity, two variants characterized here (m.5672T>C, m.4327T>C) remain “possibly pathogenic” instead of “definitely pathogenic” because insufficient conservation, absence of biochemical defect and absence of previous report. These criteria are often absent in adult patients and to increase even more the sensitivity of this scoring system, we suggest to increase the score corresponding to gold standard investigations (single-fiber studies, mutant mt-tRNA steady state level studies or trans-mitochondrial studies). We also suggest that new *in silico* tools, as MitoTIP tool, should be taken into account in the scoring⁷⁴ and that specific guidelines, on the model of nuclear variants (ACMG 2015), be used for report of new mitochondrial DNA variants.

Moreover, we also highlight the importance to study mtDNA from a clinically relevant tissue, as muscle, in patients with suspicion of mitochondrial disorder. Even if mtDNA sequencing in urine can avoid invasive biopsies in a first line, pathogenic variants can be missed, like in patient 3 and 6 in whom the variants could not be identified in urine. Muscle biopsies remain essential to investigate segregation and confirm the responsibility of the variant in the patient’s disease especially in patients with low levels of mutated DNA.

Conclusion

To conclude, despite the fact that single-fiber study is time and cost consuming, it remains a gold-standard investigation that should be extensively used in clinical laboratories to confirm the pathogenicity of the identified variants. We thus confirmed definitely the diagnosis in four patients and brought strong arguments for two others, an essential prerequisite for genetic counseling and for better management of therapeutics.

Furthermore, to avoid substantial efforts in assay design for each specific change, we plan to perform NGS approach, sensitive and accurate in detecting heteroplasmic mtDNA, on single cells and make this technique easier to use in clinical laboratories.

Figure 27 : Biochemical and Molecular Genetic Data

Patient details ¹	Clinical presentation ²	A O ³	Muscle histology ⁴	RC ⁵	Mt-DNA variant ⁶	Haplogroup	Mt-DNA variant location ⁷	In silico prediction ⁸	C ⁹	MtDNA deletion ¹⁰	Percentage mutation load		Pathogeni city score ¹⁴	Previous reports
											Patient Tissues ¹¹	Familial Tissues ¹²		
1 (M, 57)	Proximal muscle weakness in lower limbs, exercise intolerance, myalgia, CPEO	A	RRF+, COX – lipid overload	N	m.5672 T>C	H1j2a	tRNA Asn (T loop)	(20.80%) Likely benign	64.44%	N	Non available	6 points: NP	—	
2 (M, 26)	Exercise intolerance, myalgia, unilateral ptosis	C	RRF+, COX – lipid overload	N	m.12293G>A	H1	tRNA Leu (Anticodon stem)	(66.90%) Possibly pathogenic	97.78%	N	Unaffected mother B = 0%, U = 0%, BM = 0%	8 points: pp	Himiker, A., et al. 2014	
3 (F, 43)	Static cerebellar ataxia, exercise intolerance, retinitis pigmentosa	C	RRF+, COX – lipid overload	N	m.590A>G	H80	tRNA Phe (D loop)	(16.30%) Likely benign	100%	N	Unaffected mother B < 5%, U = 0%, BM = 0%	8 points: pp	—	
4 (M, 13)	exercise intolerance, myalgia, amyotrophy and mild weakness in the lower limbs, intermittent unilateral ptosis, dysarthria, Failure to thrive	C	RRF+, COX –	I, II, III, IV	m.15958A>T	H5a+T15 2C1	tRNA Pro (Amino Acid acceptor stem)	(93.80%) Likely pathogenic	97.78%	N	Unaffected mother B = 0%, U = 0%, BM = 0%	10 points: pp	Godelieve Morel, et al. 2016	
5 (F, 45)	Exercise intolerance, deafness, CPEO, underweight	C	RRF+, COX –	N	m.5703G>A	R0a2k	tRNA Asn (Anticodon stem)	(89.90%) Confirmed pathogenic	8.89%	N	Unaffected mother B = 0%, U = 0%, BM = 0%	14 points: DP	Moraes, C et al., 1993 Hao, H et al., 1997 Vives-Bauza, C et al., 2003 Nishigaki, Y et al., 2010 Elson, J. L et al., 2009 Jun Fu et al., 2019	
6 (F, 66)	Cerebellar ataxia, pyramidal syndrom Axonal sensory peripheral neuropathy, diffuse atrophy and intracranial calcifications on brain MRI	A	RRF+, COX –	N	m.4327T>C	Th6a1b4	tRNA Ile (Amino Acid acceptor stem)	(71%) Possibly pathogenic	91.11%	N	Non available	7 points: pp	—	
7 (M, 47)	Multiple lipomatosis (trunk and limbs), exercise intolerance, hypertrophy of the intratrial septum, distal amyotrophy and weakness in the lower limbs	A	RRF+, COX –	N	m.4935A>G	T2e	MT-ND2 [p.Thr156Ala]	P2: Benign S: Neutral	60%	deletion	Unaffected mother B = 0%, U = 0%, BM = 0%	—	Tang, S et al., 2013 Lihua Lyu, et al., 2019	
8 (M, 52)	Proximal muscle weakness, exercise intolerance, myalgia, episodic rhabdomyolysis, hyperlactatemia	A	RRF+, COX –	Vj	m.9166T>C	L2a1a1	MT-ATP6 [p.Phe214Leu]	P2: Probably damaging S: Deleterious	100%	N	Unaffected brother B = 0%	—	Mafalda Bacalhau, et al., 2017	

¹ Patient details include ID number, sex and age

² Clinical presentation of the patients, CPEO (Chronic Progressive External Ophthalmoplegia), MRI (magnetic resonance imaging).

³ Age at first presentation: early symptoms in childhood (C) or adult (A)

⁴ Muscle histological examinations: RRF+, Ragged Red Fibers (sub-sarcolemmal accumulations of mitochondria) are present; COX-, COX deficient fibers were present after a dual COX/SDH reaction.

⁵ RC (respiratory chain) deficiencies are listed here and include complexes (I, II, III, IV, V), normal [N]. The respiratory chain complexes activity was measured on muscle homogenates.

⁶ All mt-DNA variants are reported as heteroplasmic

⁷ Mt-DNA variant location within the standard mt-tRNA cloverleaf structure(loop) or protein changes [p.]

⁸ In silico predictions, the predictive MitoTIP scoring for tRNA variants (x) and score interpretation, Polyphen 2 [P2], SIFT [S]

⁹ C : Conservation obtained from MitoMAP database (www.mitomap.org) [Ruiz-Pesini et al., 2007]

¹⁰ Muscle long-range PCR to detect mtDNA large-scale rearrangements, Normal [N]

¹¹ Percentage mutation loads are reported per tissue. Tissues from the patient included muscle (M), blood (B), urine (U), and buccal mucosa (BM).

¹² Mutation loads were determined in a variety of tissues from maternally related individuals. Tissues examined included skeletal muscle (M), blood (B), urine (U), buccal mucosa (BM) and fibroblasts (F).

¹³ The pattern of inheritance for each mutation was determined where possible based upon mutation loads in familial tissues. no investigation [N/A]

¹⁴ Pathogenicity score, each mutation was classified according to the revised scoring system (Yarham *et al.* 2011) before our single-fiber studies. NP : Neutral polymorphism, PP : Possibly Pathogenic, DP : Definitely Pathogenic

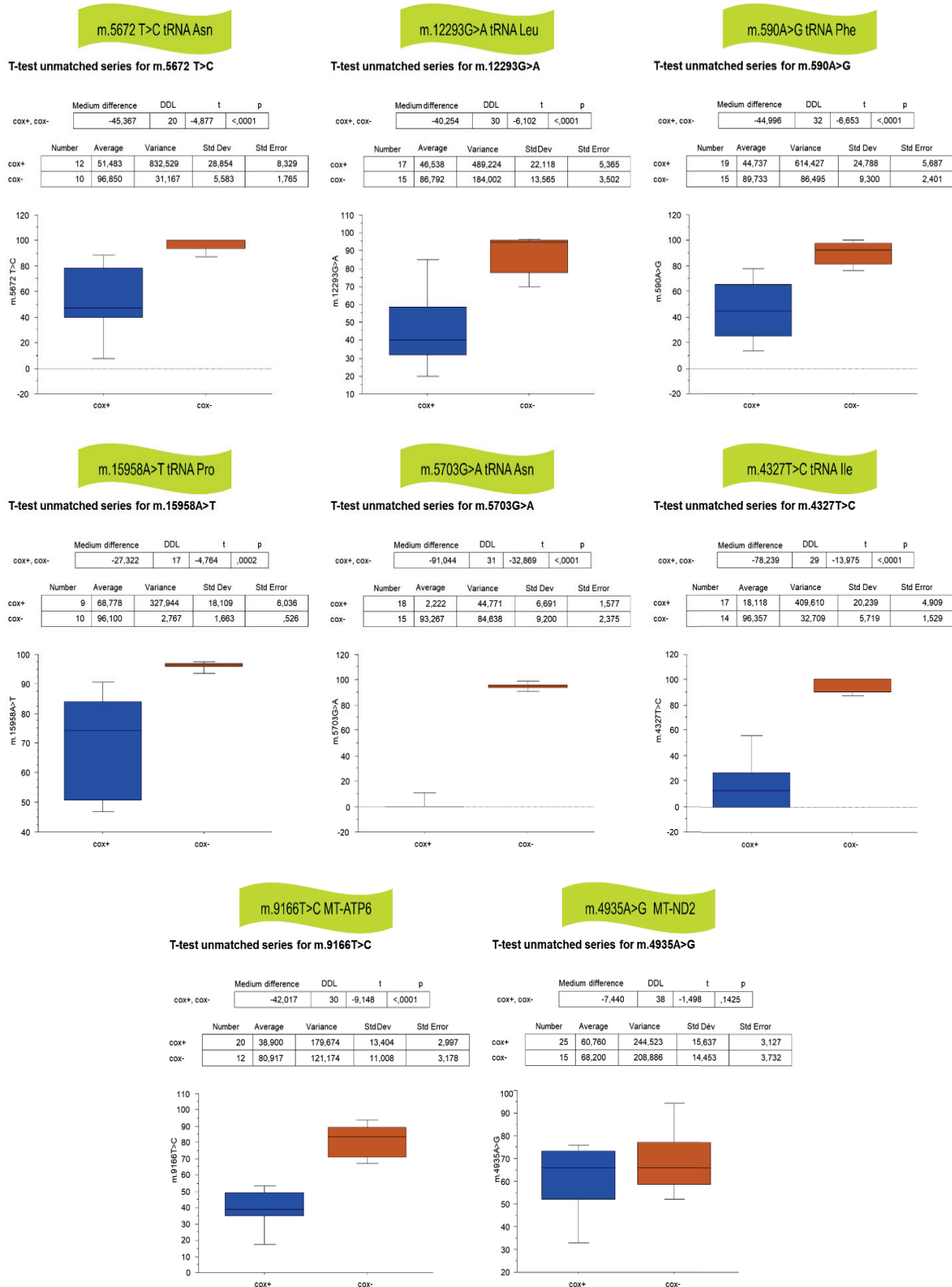


Figure 28 : Box plots of single cell heteroplasmy quantification of the eight mt-DNA variants

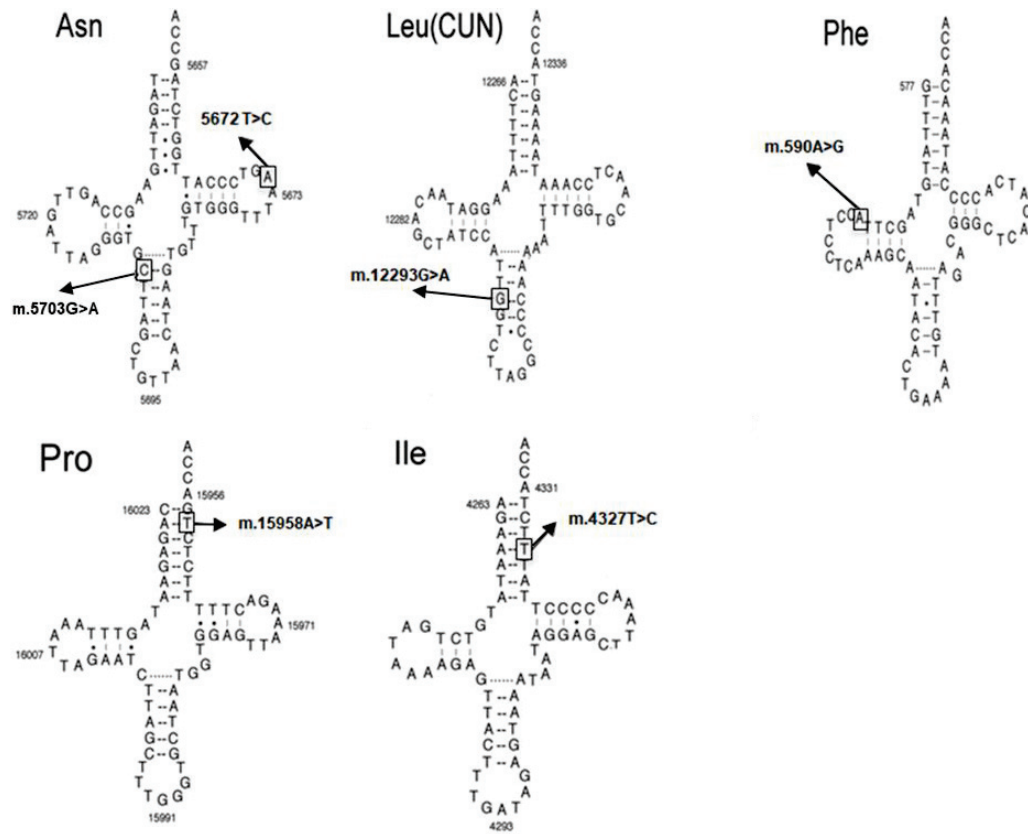


Figure 29 : Five mt-tRNA secondary structures, demonstrating the location of mt-tRNA variants. The location of each of the identified mt-tRNA variants within the tRNA cloverleaf structure is shown. The affected position and the substitution that occurs are highlighted in bold.

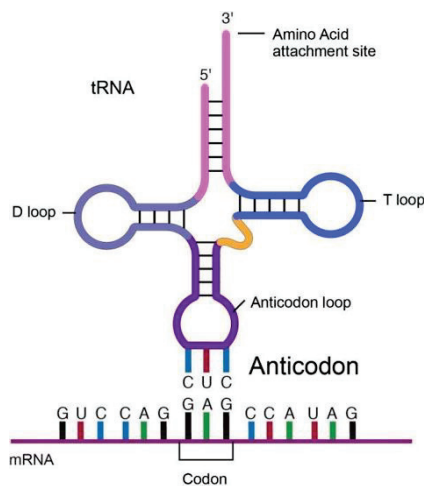


Figure 30 : Schematics of the cloverleaf secondary structure of a generic mitochondrial tRNA indicating the different segments and loops

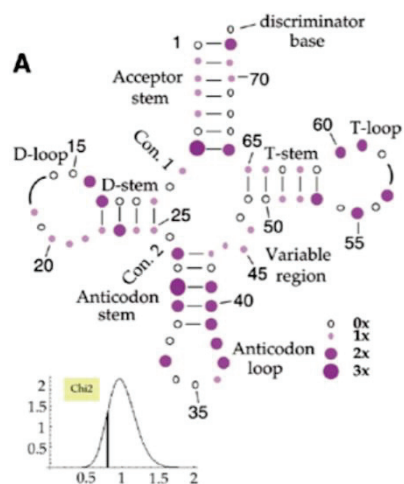


Figure 31 : Distribution of pathogenic mutations in human mitochondrial tRNA within a common cloverleaf representation. By Catherine Florentz, et al., 2001

VARIANTS	PRIMER SENS	PRIMER REVERSE	APS ¹	RS ²
M.4298G>A TRNA ^{ILE}	5'-TGA TAA AAG AGT TAC TTT GAT* G -3'	5'- AGC TTA GCG CTG TGA TGA GT -3'	265	A : BST61
M.4327T>C TRNA ^{GLN}	5'- TAA TAG GAG CTT AAA CCC CCT GA -3'	5'- AGC TTA GCG CTG TGA TGA GT -3'	237	C : MBOI
M.4935A>G MT-ND2	5'- T CCG GAC AAT GAA CCA TAA C -3'	5'- TGA TGG ATA AGA TTG AGC* T*AG -3'	246	C : NHEI
M.5672T>C ARNT ^{ASN}	5'- GCC TTC AAA GCC CTC AGT AA -3'	5'- TAC CAG CTC CGA GGT GAT TT -3'	291	C : AVAIH
M.5703G>A ARNT ^{ASN}	5'- GC CTT CAA AGC CCT CAG TAA -3'	5'- TA CCA GCT CCG AGG TGA TTT -3'	291	A : DDEI
M.9166T>C MT-ATP6	5'- CAT CAG CCT ACT CAT TCA ACC -3'	5'- GTA GAG GCT TAC TAG AAG TC*TG -3'	226	C : DDEI
M.12293G>A TRNA ^{LEU}	5'- TTA AAG GAT AAC AGC TAT CCC T -3'	5'- TGG CTC AGT GTC AGT TCG AG -3'	275	A : BSAJI
M.15958A>T TRNA ^{PRO}	5'- ATC CTA ATA CCA ACT ATC TCC C -3'	5'- AIT GGG TTT ITA TGT ACT ACA G -3'	337	C : DDEI

Supp. Table. 1 PCR primers and restriction enzymes

¹ APS: Amplification product size in base pair

² RS: Restriction enzyme, C: restriction site creation,
A : restriction site abolition

Supp. Table. 2 Mitochondrial tRNA Variants Pathogenicity score

Mt-DNA variant	Pathogenicity Classification										pathogenicity score
	More than one independent report (yes=2/no=0)	Evolutionary conservation of the base or base-pair	Variant heteroplasmy	Segregation of the mutation with diseas	Histochemical evidence of mitochondrial disease	Biochemical defect in complexes I, III, or I	Evidence of mutation segregation with biochemical defect from single-fiber studies	Mutant mt-rRNA steady-state level studies Or Evidence of pathogenicity in trans-mitochondrial cybrid studies			
m.5672 T>C	0	0	2	2	2	0	0	0	0	6	
m.12293G>A	0	2	2	2	2	0	0	0	0	8	
m.590A>G	0	2	2	2	2	0	0	0	0	8	
m.15958A>T	0	2	2	2	2	2	0	0	0	10	
m.5703G>A	2	0	2	0	2	0	3	5	5	14	
m.4327T>C	0	1	2	2	2	0	0	0	0	7	

7. Discussion et conclusion

La grande hétérogénéité des MM est bien retrouvée chez les huit patients étudiés ici. L'absence de relation phénotype-génotype rend l'établissement d'un diagnostic précis extrêmement difficile et illustre l'importance de définir une stratégie pour interpréter les variants retrouvés.

Distinguer les mutations pathogènes des variants polymorphes reste difficile dans toutes les branches de la génétique, notamment la génétique mitochondriale. À l'heure actuelle, les preuves sont insuffisantes pour classer comme pathogènes une grande proportion des mutations mitochondriales signalées sur les bases de données. De plus, la généralisation de l'utilisation du NGS en routine à but diagnostique a augmenté considérablement le nombre de variants retrouvés.

Les preuves de ségrégation du variant avec le défaut biochimique tirées des études sur fibre unique représentent le gold standard des investigations pour attribuer la pathogénicité aux variants retrouvés. De plus, elle permet de trancher quant à la pathogénicité d'un variant retrouvé avec un faible taux d'hétéroplasmie sur le muscle et sur les urines.

La PCR-RFLP fluorescente, technique que nous avons utilisée pour la réalisation de ce travail, présente comme avantages d'être sensible et reproductible, facile à mettre en œuvre et peu coûteuse. Cependant, cette méthode ne peut analyser que des mutations connues, précédemment identifiées par une méthode de séquençage. Elle n'est pas standardisée et implique donc des efforts importants en termes de conception, d'optimisation et de calcul d'hétéroplasmie pour chaque variant. La mise en place d'une PCR avec des amorces spécifiques pour chaque variant, nécessitant parfois de les modifier avec des mismatch afin d'obtenir un site de restriction, rend cette technique peu pratique en routine. L'existence et la disponibilité d'une enzyme de restriction pour les différents variants représentent un autre facteur limitant.

La suite de cette étude consiste à standardiser cet outil diagnostique, à le rendre non dépendant des variants, plus rapide et plus facile à réaliser en routine sans perdre en sensibilité et en spécificité. L'approche NGS, en plus de nous offrir un débit très important, permet la détection et la quantification d'un faible taux d'hétéroplasmie sur fibre unique.

Nous avons procédé à des essais pour comparer la sensibilité, la spécificité et la précision de la quantification de l'hétéroplasmie sur fibre unique de la technique NGS vs la technique PCR fluorescente. Nous avons réussi à amplifier sur la même cellule des fragments d'ADNmt pour

les analyser simultanément avec les deux techniques. Ces fragments sont de tailles différentes (300pb à 2KB) afin d'étudier l'impact des pseudogènes sur la quantification de l'hétéroplasmie. Cette deuxième phase du projet est actuellement en cours de réalisation.

La détermination de la pathogénicité des variants identifiés par le NGS devient un objectif majeur pour réduire l'errance diagnostique chez les patients. La quantification de l'hétéroplasmie sur fibre unique est une méthode de référence pour l'évaluation du lien de causalité mutation-maladie et doit être utilisée systématiquement pour le diagnostic des maladies mitochondriales. Dans cet objectif, nous avons conçu un outil simple et rapide afin de valider la ségrégation de la mutation avec le défaut biochimique sur fibre unique. Cela nous a permis de confirmer le diagnostic chez sept patients, un préalable indispensable au conseil génétique et à une meilleure prise en charge thérapeutique.

Les variants rapportés ici devraient être ajoutés aux bases de données des variants de mt-ARN associés aux maladies mitochondriales.

8. Bibliographie

1. Durham, S. E., Samuels, D. C., Cree, L. M. & Chinnery, P. F. Normal Levels of Wild-Type Mitochondrial DNA Maintain Cytochrome c Oxidase Activity for Two Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations but Not for m.3243A→G. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 189–195 (2007).
2. Jackson, C. B. *et al.* Novel mitochondrial tRNA^{Leu} m.4282A>G gene mutation leads to chronic progressive external ophthalmoplegia plus phenotype. *Br. J. Ophthalmol.* **98**, 1453–1459 (2014).
3. Yu-Wai-Man, P. *et al.* Somatic Mitochondrial DNA Deletions Accumulate to High Levels in Aging Human Extraocular Muscles. *Investig. Ophthalmology Vis. Sci.* **51**, 3347 (2010).
4. Pagliarini, D. J. *et al.* A Mitochondrial Protein Compendium Elucidates Complex I Disease Biology. *Cell* **134**, 112–123 (2008).
5. Sagan, L. On the Origin of Mitosing Clds. 56
6. von Heijne, G. Why mitochondria need a genome. *FEBS Lett.* **198**, 1–4 (1986).
7. Alberts B, Johnson A, Lewis J, *et al.* Molecular Biology of the Cell, 4th edition. in *Molecular Biology of the Cell, 4th edition* (2002).
8. Taylor, S. W. *et al.* Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat. Biotechnol.* **21**, 281–286 (2003).
9. Zhang, J. *et al.* Altered Proteome Biology of Cardiac Mitochondria Under Stress Conditions. *J. Proteome Res.* **7**, 2204–2214 (2008).
10. Herrmann, J. M. & Neupert, W. Protein transport into mitochondria. *Curr. Opin. Microbiol.* **3**, 210–214 (2000).
11. Mannella, C. A. Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1763**, 542–548 (2006).

12. Fox, T. D. Mitochondrial Protein Synthesis, Import, and Assembly. *Genetics* **192**, 1203–1234 (2012).
13. Twig, G. *et al.* Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* **27**, 433–446 (2008).
14. Youle, R. J. & van der Bliek, A. M. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science* **337**, 1062–1065 (2012).
15. Otera, H., Ishihara, N. & Mihara, K. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.* **1833**, 1256–1268 (2013).
16. Cobb, L. J. *et al.* Naturally occurring mitochondrial-derived peptides are age-dependent regulators of apoptosis, insulin sensitivity, and inflammatory markers. *Aging* **8**, 796–808 (2016).
17. Calvo, S. E. & Mootha, V. K. The Mitochondrial Proteome and Human Disease. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* **11**, 25–44 (2010).
18. Kukat, C. *et al.* Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108**, 13534–13539 (2011).
19. Stewart, J. B. & Chinnery, P. F. The dynamics of mitochondrial DNA heteroplasmy: implications for human health and disease. *Nat. Rev. Genet.* **16**, 530–542 (2015).
20. Elson, J. L. *et al.* Analysis of European mtDNAs for Recombination. *Am. J. Hum. Genet.* **68**, 145–153 (2001).
21. Wanrooij, S. *et al.* In vivo mutagenesis reveals that OriL is essential for mitochondrial DNA replication. *EMBO Rep.* **13**, 1130–1137 (2012).

22. Raap, A. K. *et al.* Non-Random mtDNA Segregation Patterns Indicate a Metastable Heteroplasmic Segregation Unit in m.3243A>G Cybrid Cells. *PLoS ONE* **7**, e52080 (2012).
23. Gross, J. & Getz, G. S. Apparent Turnover of Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid and Mitochondrial Phospholipids in the Tissues of the Rat. **244**, 12 (1969).
24. Diaz, F. Human mitochondrial DNA with large deletions repopulates organelles faster than full-length genomes under relaxed copy number control. *Nucleic Acids Res.* **30**, 4626–4633 (2002).
25. Carling, P. J., Cree, L. M. & Chinnery, P. F. The implications of mitochondrial DNA copy number regulation during embryogenesis. *Mitochondrion* **11**, 686–692 (2011).
26. Stewart, J. B. & Larsson, N.-G. Keeping mtDNA in Shape between Generations. *PLoS Genet.* **10**, e1004670 (2014).
27. Gómez-Durán, A. *et al.* Unmasking the causes of multifactorial disorders: OXPHOS differences between mitochondrial haplogroups. *Hum. Mol. Genet.* **19**, 3343–3353 (2010).
28. Jiménez-Sousa, M. A. *et al.* Mitochondrial DNA haplogroups are associated with severe sepsis and mortality in patients who underwent major surgery. *J. Infect.* **70**, 20–29 (2015).
29. Hudson, G. *et al.* Two-stage association study and meta-analysis of mitochondrial DNA variants in Parkinson disease. *Neurology* **80**, 2042–2048 (2013).
30. Calabrese, F. M., Simone, D. & Attimonelli, M. Primates and mouse NumtS in the UCSC Genome Browser. *BMC Bioinformatics* **13**, S15 (2012).
31. Dayama, G., Emery, S. B., Kidd, J. M. & Mills, R. E. The genomic landscape of polymorphic human nuclear mitochondrial insertions. *Nucleic Acids Res.* **42**, 12640–12649 (2014).
32. Leister, D. Origin, evolution and genetic effects of nuclear insertions of organelle DNA. *Trends Genet.* **21**, 655–663 (2005).

33. Yao, Y.-G., Kong, Q.-P., Salas, A. & Bandelt, H.-J. Pseudomitochondrial genome haunts disease studies. *J. Med. Genet.* **45**, 769–772 (2008).
34. Sobenin, I. A. *et al.* Quantitative Assessment of Heteroplasmy of Mitochondrial Genome: Perspectives in Diagnostics and Methodological Pitfalls. *BioMed Res. Int.* **2014**, 1–9 (2014).
35. Dapprich, J. *et al.* The next generation of target capture technologies - large DNA fragment enrichment and sequencing determines regional genomic variation of high complexity. *BMC Genomics* **17**, (2016).
36. Zhang, W., Cui, H. & Wong, L.-J. C. Comprehensive One-Step Molecular Analyses of Mitochondrial Genome by Massively Parallel Sequencing. *Clin. Chem.* **58**, 1322–1331 (2012).
37. Ancora, M. *et al.* Complete sequence of human mitochondrial DNA obtained by combining multiple displacement amplification and next-generation sequencing on a single oocyte. *Mitochondrial DNA Part A* **28**, 180–181 (2017).
38. Zong, C., Lu, S., Chapman, A. R. & Xie, X. S. Genome-Wide Detection of Single-Nucleotide and Copy-Number Variations of a Single Human Cell. *Science* **338**, 1622–1626 (2012).
39. Barnes, W. M. PCR amplification of up to 35-kb DNA with high fidelity and high yield from A bacteriophage templates. *Proc Natl Acad Sci USA* **5** (1994).
40. Cheng, S., Fockler, C., Barnes, W. M. & Higuchi, R. Effective amplification of long targets from cloned inserts and human genomic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 5695–5699 (1994).
41. Bai, R.-K. Detection and Quantification of Heteroplasmic Mutant Mitochondrial DNA by Real-Time Amplification Refractory Mutation System Quantitative PCR Analysis: A Single-Step Approach. *Clin. Chem.* **50**, 996–1001 (2004).

42. Williams, R. *et al.* Amplification of complex gene libraries by emulsion PCR. *Nat. Methods* **3**, 545–550 (2006).
43. Belmonte, F. R. *et al.* Digital PCR methods improve detection sensitivity and measurement precision of low abundance mtDNA deletions. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
44. Wallace, D. C. A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: A Dawn for Evolutionary Medicine. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 359–407 (2005).
45. Elliott, H. R., Samuels, D. C., Eden, J. A., Relton, C. L. & Chinnery, P. F. Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Are Common in the General Population. *Am. J. Hum. Genet.* **83**, 254–260 (2008).
46. DiMauro, S., Schon, E. A., Carelli, V. & Hirano, M. The clinical maze of mitochondrial neurology. *Nat. Rev. Neurol.* **9**, 429–444 (2013).
47. Vafai, S. B. & Mootha, V. K. Mitochondrial disorders as windows into an ancient organelle. *Nature* **491**, 374–383 (2012).
48. Limongelli, A. Variable penetrance of a familial progressive necrotising encephalopathy due to a novel tRNA^{Ile} homoplasmic mutation in the mitochondrial genome. *J. Med. Genet.* **41**, 342–349 (2004).
49. Kirkman, M. A. *et al.* Gene–environment interactions in Leber hereditary optic neuropathy. *Brain* **132**, 2317–2326 (2009).
50. Hudson, G. *et al.* Clinical Expression of Leber Hereditary Optic Neuropathy Is Affected by the Mitochondrial DNA–Haplogroup Background. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 228–233 (2007).
51. Morava, E. *et al.* Mitochondrial disease criteria: Diagnostic applications in children. *Neurology* **67**, 1823–1826 (2006).

52. Brandon, M. C. MITOMAP: a human mitochondrial genome database--2004 update. *Nucleic Acids Res.* **33**, D611–D613 (2004).
53. Gorman, G. S. *et al.* Prevalence of nuclear and mitochondrial DNA mutations related to adult mitochondrial disease: Adult Mitochondrial Disease. *Ann. Neurol.* **77**, 753–759 (2015).
54. Rahman, J. & Rahman, S. Mitochondrial medicine in the omics era. *The Lancet* **391**, 2560–2574 (2018).
55. Anderson, S. *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome *Nature* volume 290, pages457–465 (1981)
56. Wallace, D. C. Why Do We Still Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 781–821 (2007).
57. On behalf of the ACMG Laboratory Quality Assurance Committee *et al.* Standards and guidelines for the interpretation of sequence variants: a joint consensus recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet. Med.* **17**, 405–423 (2015).
58. McFarland, R., Elson, J. L., Taylor, R. W., Howell, N. & Turnbull, D. M. Assigning pathogenicity to mitochondrial tRNA mutations: when ‘definitely maybe’ is not good enough. *Trends Genet.* **20**, 591–596 (2004).
59. DiMauro, S. & Schon, E. A. Mitochondrial DNA mutations in human disease. *Am. J. Med. Genet.* **106**, 18–26 (2001).
60. Boulet, L., Karpati, G. & Shoubridge, E. A. Distribution and Threshold Expression of the tRNA^Ys Mutation in Skeletal Muscle of Patients with Myoclonic Epilepsy and Ragged-Red Fibers (MERRF). 14
61. DiMauro, S. & Moraes, C. T. Mitochondrial Encephalomyopathies. 12

62. Yarham, J. W. *et al.* A comparative analysis approach to determining the pathogenicity of mitochondrial tRNA mutations. *Hum. Mutat.* **32**, 1319–1325 (2011).
63. Moraes CT, DiMauro S, Zeviani M, Lombes A, Shanske S, Miranda AF, Nakase H, Bonilla E, Werneck LC, Servidei S Mitochondrial DNA deletions in progressive external ophthalmoplegia and Kearns-Sayre syndrome. *N Engl J Med.* 1989 May 18; 320(20):1293-9.
64. Plutino, M. *et al.* Targeted next generation sequencing with an extended gene panel does not impact variant detection in mitochondrial diseases. *BMC Med. Genet.* **19**, (2018).
65. Rustin, P. *et al.* Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin. Chim. Acta* **228**, 35–51 (1994).
66. Schägger H, Pfeiffer K. The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-IV in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes, *J Biol Chem*, 2001, vol. 276 (pg. 378617).
67. Fragaki, K. *et al.* Assembly defects of multiple respiratory chain complexes in a child with cardiac hypertrophy associated with a novel ACAD9 mutation. *Mol. Genet. Metab.* **121**, 224–226 (2017).
68. Morel, G. *et al.* A new mutation in the mitochondrial tRNA^{Pro} gene associated with early-onset neuromuscular phenotype and ragged-red fibers. *Neuromuscul. Disord.* **26**, 885–889 (2016).
69. Paul R, Santucci S, Saunières A, et al. Rapid mapping of mitochondrial dna deletions by large-fragment PCR. *Trends Genet.* 1996;12:131–132.
70. Sonney, S. *et al.* Predicting the pathogenicity of novel variants in mitochondrial tRNA with MitoTIP. *PLOS Comput. Biol.* **13**, e1005867 (2017).
71. Kumar, P., Henikoff, S. & Ng, P. C. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat. Protoc.* **4**, 1073–1081 (2009).

72. Adzhubei, I. A. *et al.* A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat. Methods* **7**, 248–249 (2010).
73. Hiniker, A. *et al.* Axial mitochondrial myopathy in a patient with rapidly progressive adult-onset scoliosis. *Acta Neuropathol. Commun.* **2**, (2014).
74. Bacalhau, M. *et al.* In silico analysis for predicting pathogenicity of five unclassified mitochondrial DNA mutations associated with mitochondrial cytopathies' phenotypes. *Eur. J. Med. Genet.* **60**, 172–177 (2017).
75. Moraes, C. T. *et al.* Two Novel Pathogenic Mitochondrial DNA Mutations Affecting Organelle Number and Protein Synthesis. **10**
76. Hao, H. & Moraes, C. T. A disease-associated G5703A mutation in human mitochondrial DNA causes a conformational change and a marked decrease in steady-state levels of mitochondrial tRNA(Asn). *Mol. Cell. Biol.* **17**, 6831–6837 (1997).
77. Nishigaki, Y. *et al.* Extensive screening system using suspension array technology to detect mitochondrial DNA point mutations. *Mitochondrion* **10**, 300–308 (2010).
78. Elson, J. L. *et al.* Pathogenic mitochondrial tRNA mutations - Which mutations are inherited and why? *Hum. Mutat.* **30**, E984–E992 (2009).
79. Fu, J. *et al.* Broadening the phenotype of m.5703G>A mutation in mitochondrial tRNAAsn gene from mitochondrial myopathy to myoclonic epilepsy with ragged red fibers syndrome: *Chin. Med. J. (Engl.)* **132**, 865–867 (2019).
80. Tang, S. & Huang, T. Characterization of mitochondrial DNA heteroplasmy using a parallel sequencing system. *BioTechniques* **48**, 287–296 (2010).
81. Lyu, L. *et al.* Dataset of mitochondrial genome variants in oncocytic tumors. *Data Brief* **17**, 1149–1152 (2018).
82. Moslemi, A.-R. *et al.* A novel mutation in the mitochondrial tRNAPhe gene associated with mitochondrial myopathy. *Neuromuscul. Disord.* **14**, 46–50 (2004).

83. Deschauer, M., Swalwell, H., Strauss, M., Zierz, S. & Taylor, R. W. Novel Mitochondrial Transfer RNAPhe Gene Mutation Associated With Late-Onset Neuromuscular Disease. *Arch. Neurol.* **63**, 902 (2006).
84. Sohm, B. *et al.* Towards Understanding Human Mitochondrial Leucine Aminoacylation Identity. *J. Mol. Biol.* **328**, 995–1010 (2003).
85. Genet, A. J. H. A New mtDNA Mutation Showing Accumulation with Time and Restriction to Skeletal Muscle K. Weber,¹ J. N. Wilson,² L. Taylor,³ E. Brierley,^{1,2} M. A. Johnson,^{1,3} D. M. Turnbull,⁴ and L. A. Bindoff⁴. *Am J Hum Genet* **8** (1997).
86. Florentz, C. & Sissler, M. Disease-related versus polymorphic mutations in human mitochondrial tRNAs: Where is the difference? *EMBO Rep.* **2**, 481–486 (2001).
87. Tang, S. *et al.* Transition to Next Generation Analysis of the Whole Mitochondrial Genome: A Summary of Molecular Defects. *Hum. Mutat.* **34**, 882–893 (2013).
88. Ugalde, C. *et al.* Mutated ND2 impairs mitochondrial complex I assembly and leads to Leigh Syndrome. *Mol. Genet. Metab.* **90**, 10–14 (2007).
89. Brown, M. D. *et al.* Novel mtDNA mutations and oxidative phosphorylation dysfunction in Russian LHON families. *Hum. Genet.* **109**, 33–39 (2001).
90. Schwartz, M. & Vissing, J. 082202 Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA. *N. Engl. J. Med.* **5**
91. Pulkes, T. *et al.* Nonsense mutations in mitochondrial DNA associated with myalgia and exercise intolerance. *Neurology* **64**, 1091–1092 (2005).
92. Thorburn, D. R., Rahman, J. & Rahman, S. Mitochondrial DNA-Associated Leigh Syndrome and NARP. *Mitochondrial DNA* **48**
93. Ware, S. M. *et al.* Infantile cardiomyopathy caused by a mutation in the overlapping region of mitochondrial ATPase 6 and 8 genes. *J. Med. Genet.* **46**, 308–314 (2009).