

# Diagnostic biologique des maladies mitochondriales

---



## **Claude Jardel**

Service de Biochimie métabolique (Pr Rousselot)  
UF de biochimie des maladies neurométaboliques  
Centre de génétique moléculaire et  
chromosomique  
GH Pitié Salpêtrière-Charles Foix

INSERM UMRS1016-Institut Cochin

# Maladies mitochondriales

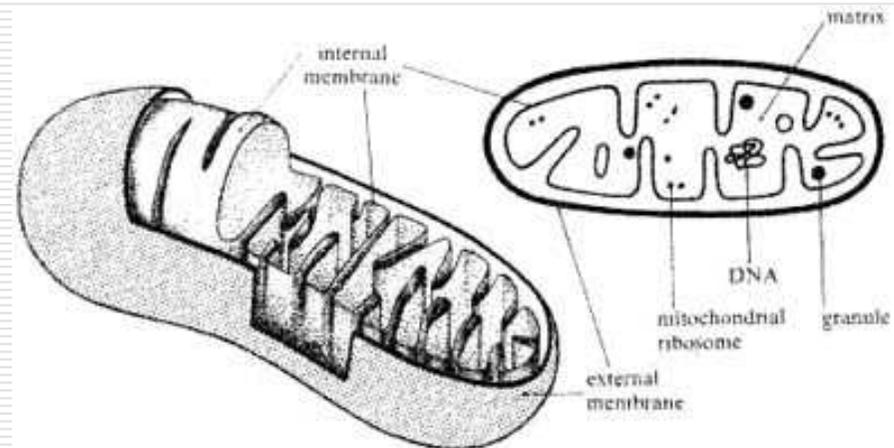
---

- ❑ maladies dues à un **dysfonctionnement de la chaîne des OXPHOS**
  - ❑ Cliniquement et génétiquement hétérogènes
  - ❑ Maladies rares mais + fréquentes qu'on ne le pensait environ 1/7000
  - ❑ Pas de traitement
-

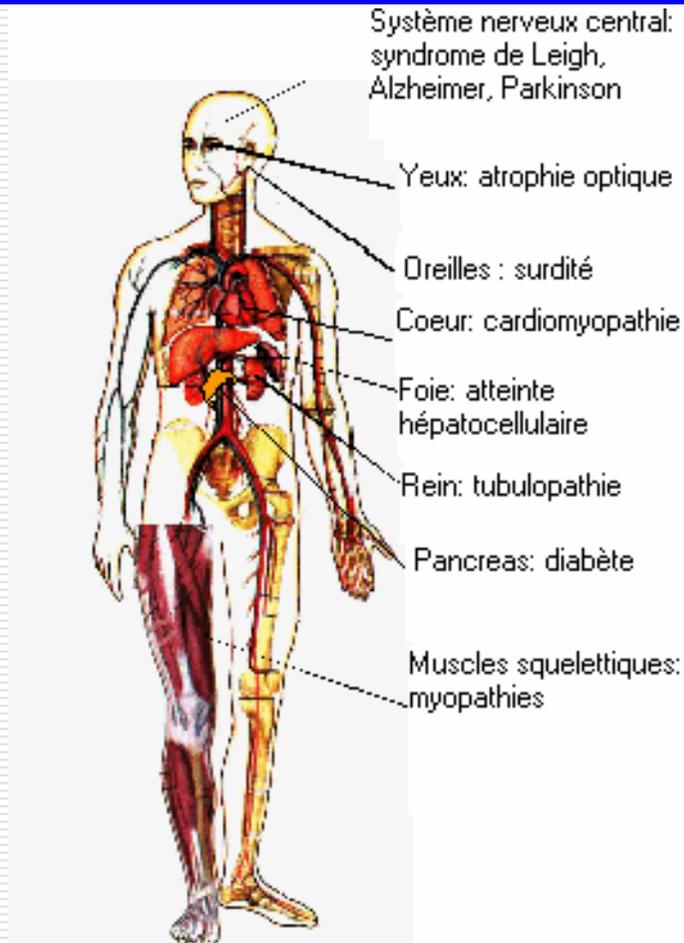
# Maladies Mitochondriales

---

- ❑ N'importe quel symptôme
- ❑ Tous les organes
- ❑ Tous les tissus
- ❑ À tout âge
- ❑ Tout mode de transmission



# maladies mitochondriales : tableaux cliniques très hétérogènes



- ❖ **MUSCLE** (Intolérance à l'exercice, PEO, Faiblesse, Myolyse)
- ❖ **CERVEAU** (Démence, Epilepsie, Acc.pseudo-vasculaires, Ataxie...)
- ❖ **NERF PÉRIPHÉRIQUE** (Axonopathie, Neuropathie démyélinisante....)
- ❖ **ORGANES DES SENS** ( Rétinopathie, Atrophie optique, Surdité)
- ❖ **COEUR** (Cardiomyopathie, Troubles de la conduction...)
- ❖ **HORMONES** (Diabète, Insuffisance parathyroïde, Hypofertilité...)
- ❖ **REIN** (Tubulopathie, Glomérulopathie, Insuffisance rénale...)
- ❖ **FOIE** (Cirrhose, Insuffisance hépatique,...)
- ❖ **SANG** (Anémie sidéroblastique...)

# À n'importe quel âge

---

Syndrome de Leigh à  
quelques mois de vie

---

Camptocormie à 75 ans

# Phénotypes très variables

---

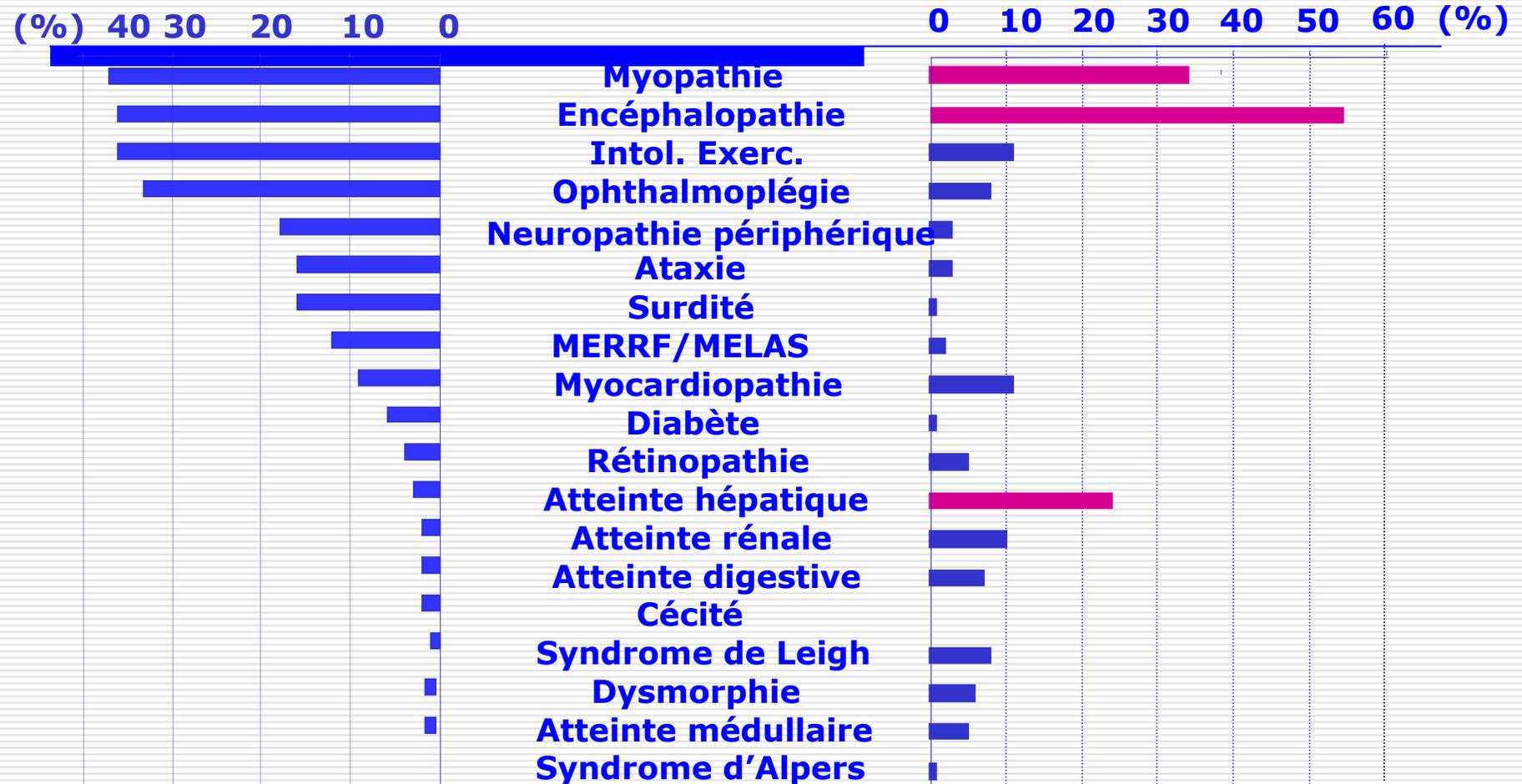
m.8344A>G  
(MERRF)

PEO:  
délétion  
ADNmt

MNGIE:  
déficit TP

---

# Clinique des maladies mitochondriales

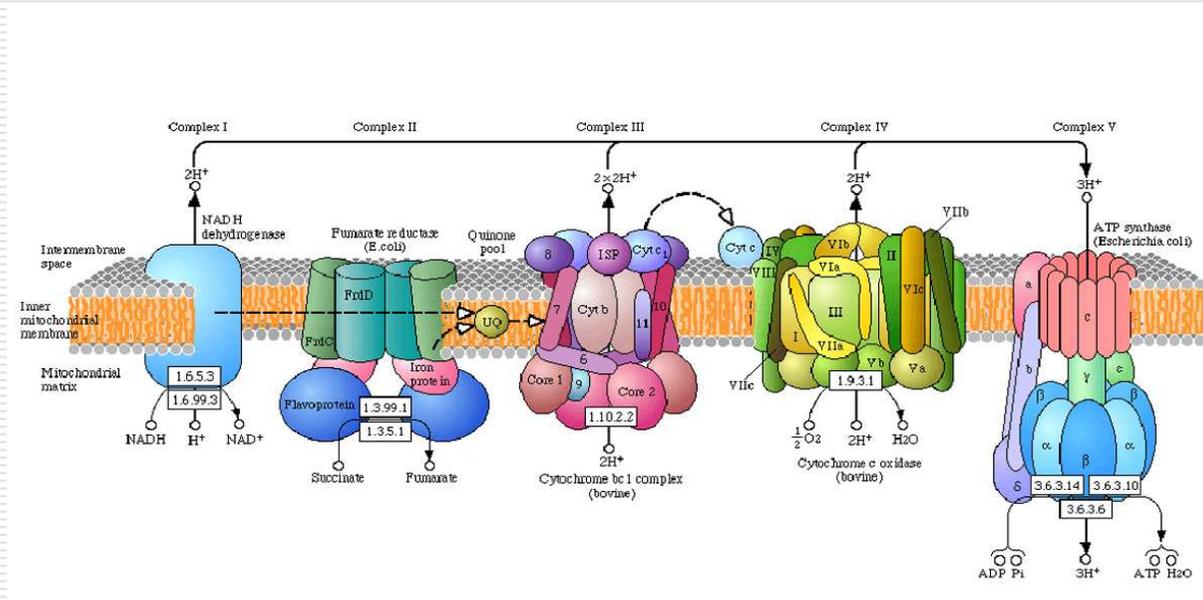


**Adultes (n = 390)**  
**Mal. multisyst.: 35%**

**Enfants (n = 220)**  
**Mal. multisyst.: 49%**

# Diagnostic des maladies mitochondriales

maladies associées à un dysfonctionnement de la chaîne respiratoire et donc de la production d'énergie directement utilisable par la cellule



# Stratégie diagnostique fondée sur

---

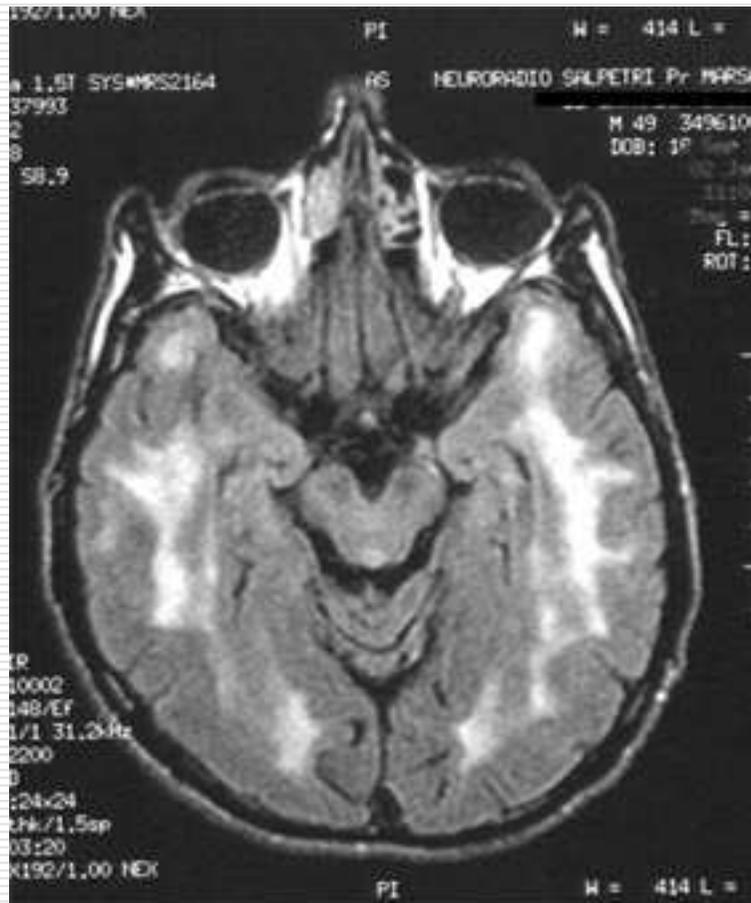
- Signes cliniques
  - Mode de transmission
  - Imagerie (IRM, tomomodensitométrie)
  - Balance Redox
  - Histologie musculaire
  - Activité des complexes de la chaîne respiratoire: muscle, foie, fibroblastes..
  - Génétique moléculaire : ADNmt et ADN nucléaire
-

# Clinique: quand y penser?

---

- syndrome défini :
    - MELAS (Mitochondrial Myopathy, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke like episodes ),
    - MERRF (Myoclonic Epilepsy and Ragged Red Fibers),
    - NARP (Neuropathie, ataxie, rétinite pigmentaire),
    - Syndromes de Pearson, Kearns Sayre, Leigh, Alpers
  - Atrophie optique héréditaire de Leber (LHON)
  - associations illégitimes (diabète, surdité)
  - atteinte de tissus très consommateurs d'énergie
  - évolution progressive
-

# Imagerie

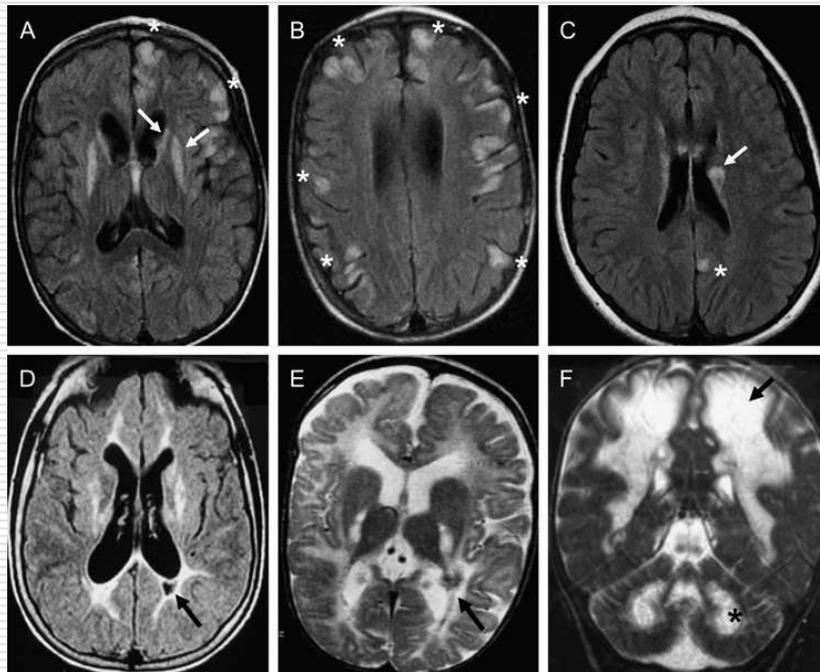


**Leucodystrophie :MNGIE**

**Mitochondrial Neuro Gastro Intestinal Encephalomyopathy: déficit en TP**

# Stroke-like et leucoencéphalopathie

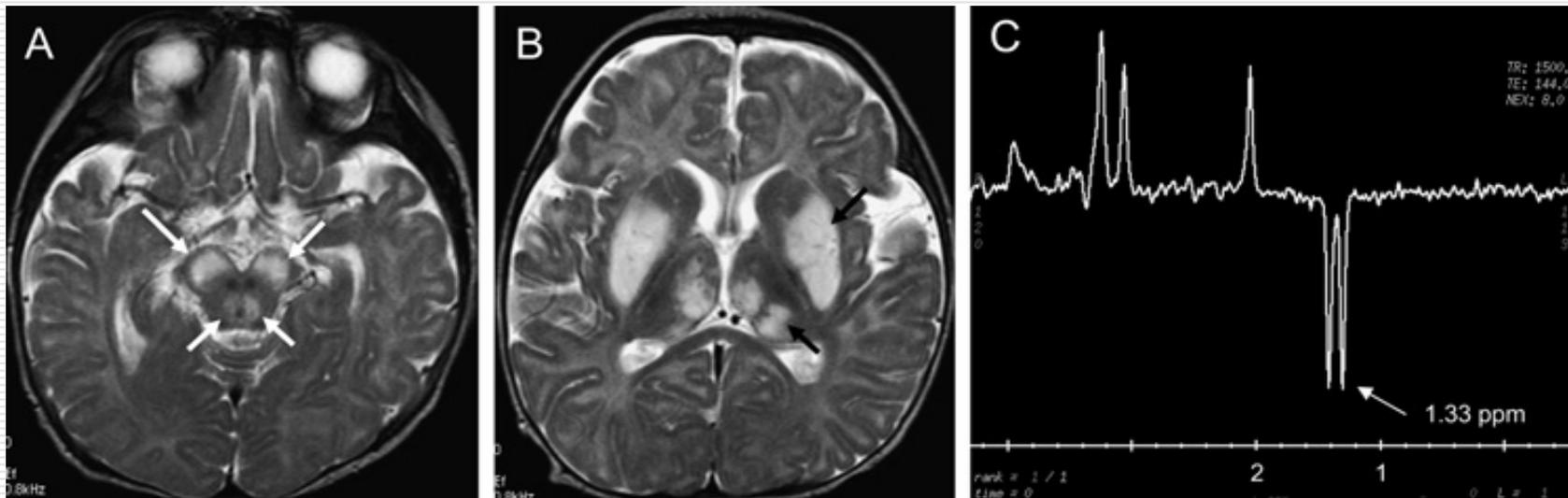
---



- A à C:
  - stroke like (étoiles)
  - hypersignaux des ganglions de la base (flèches blanches)
  
- D à F:
  - leucoencéphalopathie nécrotique ou kystique (flèches noires)

# Déficit en CI: (mutation MT-ND3 chez un enfant de 4 mois)

---



IRM: Séquences axiales T2

(A) hypersignaux bilatéraux du tronc cérébral

(B) Hyper signaux des noyaux lenticulaires et des thalami

RMN (C) des noyaux lenticulaires (pic de lactate)

---

# Explorations métaboliques *in vitro* :

---

- ❑ lactate, pyruvate dans les liquides biologiques
  - sang, urines et/ou LCR
  - Rapport L/P
  - Au repos et/ou après stimulation
    - Charge en glucose
    - Tests d'effort
- ❑ 3OH butyrate, acétoacétate 3OHB/AcAc
- ❑ Corps cétoniques élevés en post prandial
- ❑ Chromatographie des acides aminés plasmatiques: alanine et proline
- ❑ Chromatographie des acides organiques urinaires:

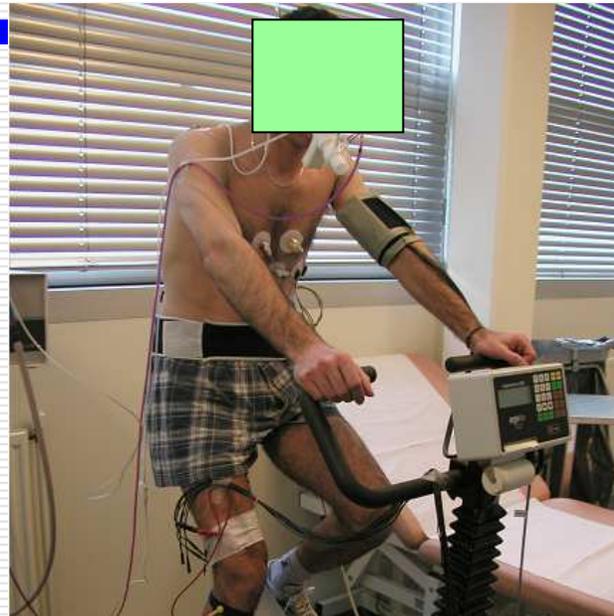


Conditions de prélèvement

# études métaboliques *in vivo*

Test effort non-ischémique  
avant bras  
(grip test)

*(J-Y Hogrel)*



Épreuve d'effort sur  
bicyclette ergométrique

*(J Vissing, M Zelter)*

spectroscopie  
RMN  $^{31}\text{P}$  et  $^{13}\text{C}$

*(P Carlier, C Wary)*

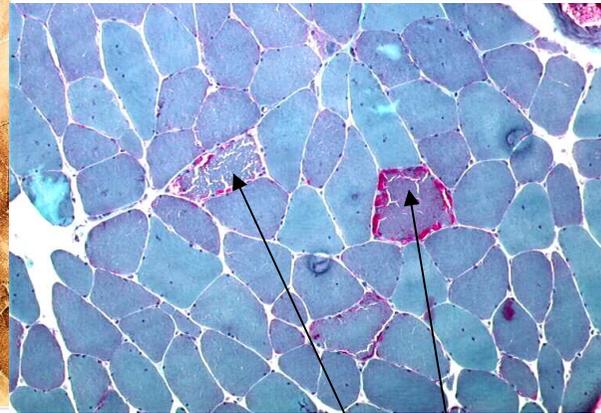


# Histologie musculaire

---

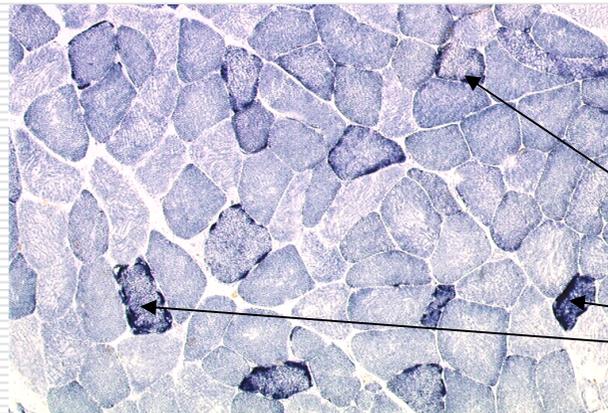
« fibres COX negatives »

COX



trichrome  
De Gomori

SDH



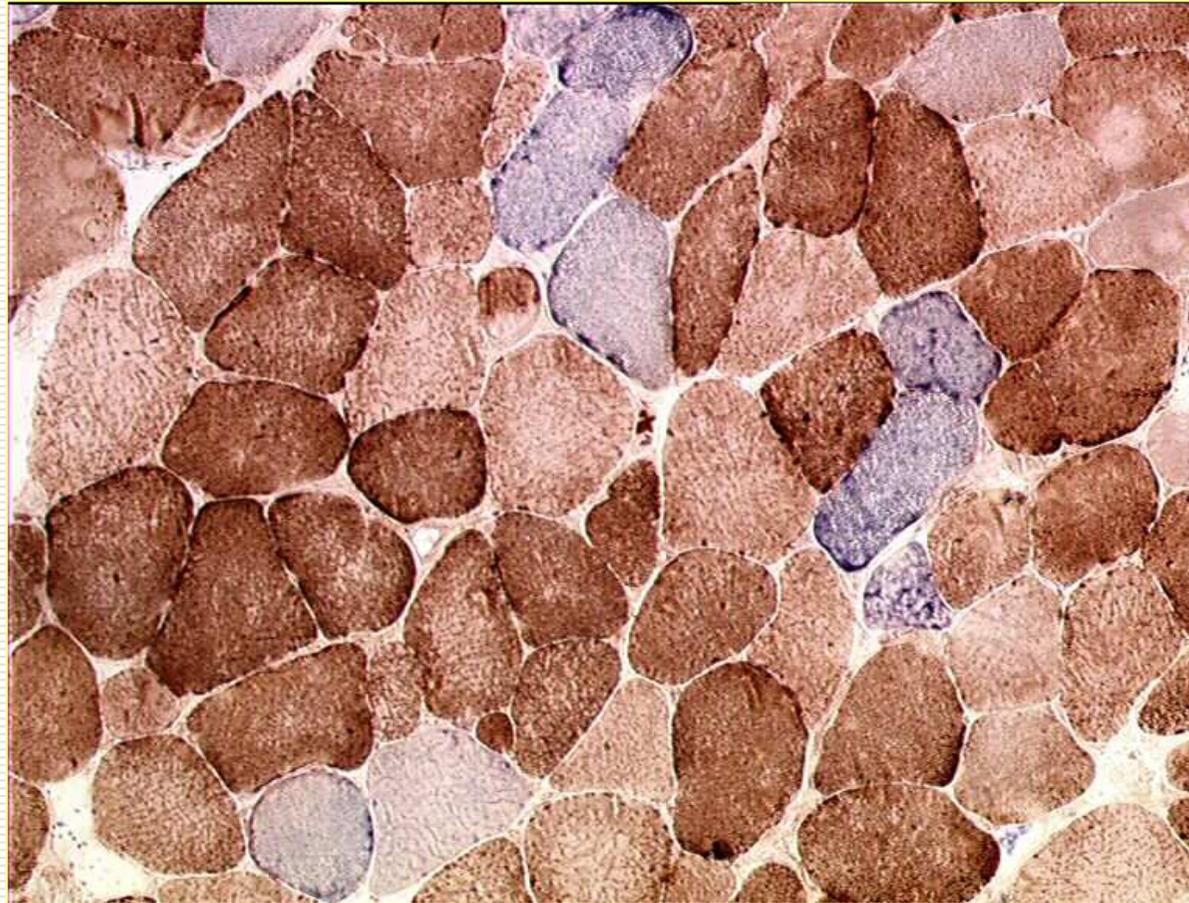
Fibres « RRF »

---

RRF: ragged red fibres

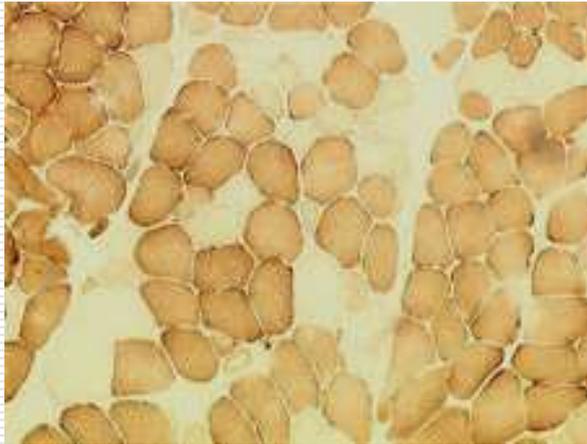
# COX et SDH: ragged blue fibres

---

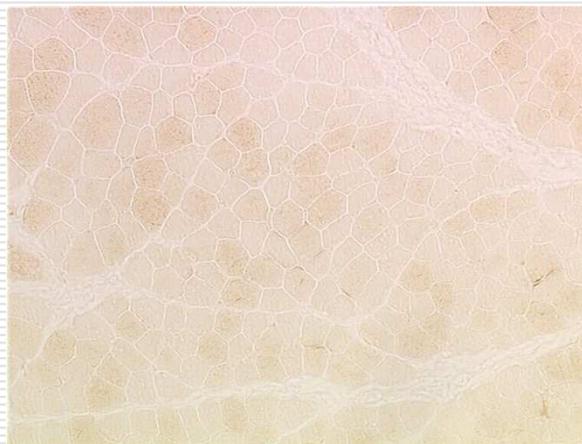


# Analyses histochimiques de l'activité de la chaîne respiratoire

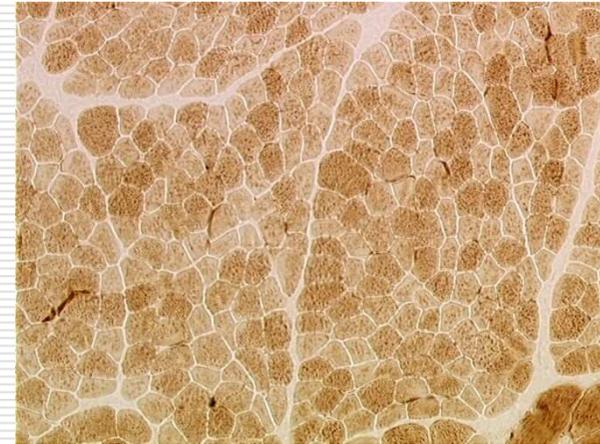
---



Déficit en mosaïque



Déficit homogène



Contrôle

Complexe IV (cytochrome c oxydase)

---

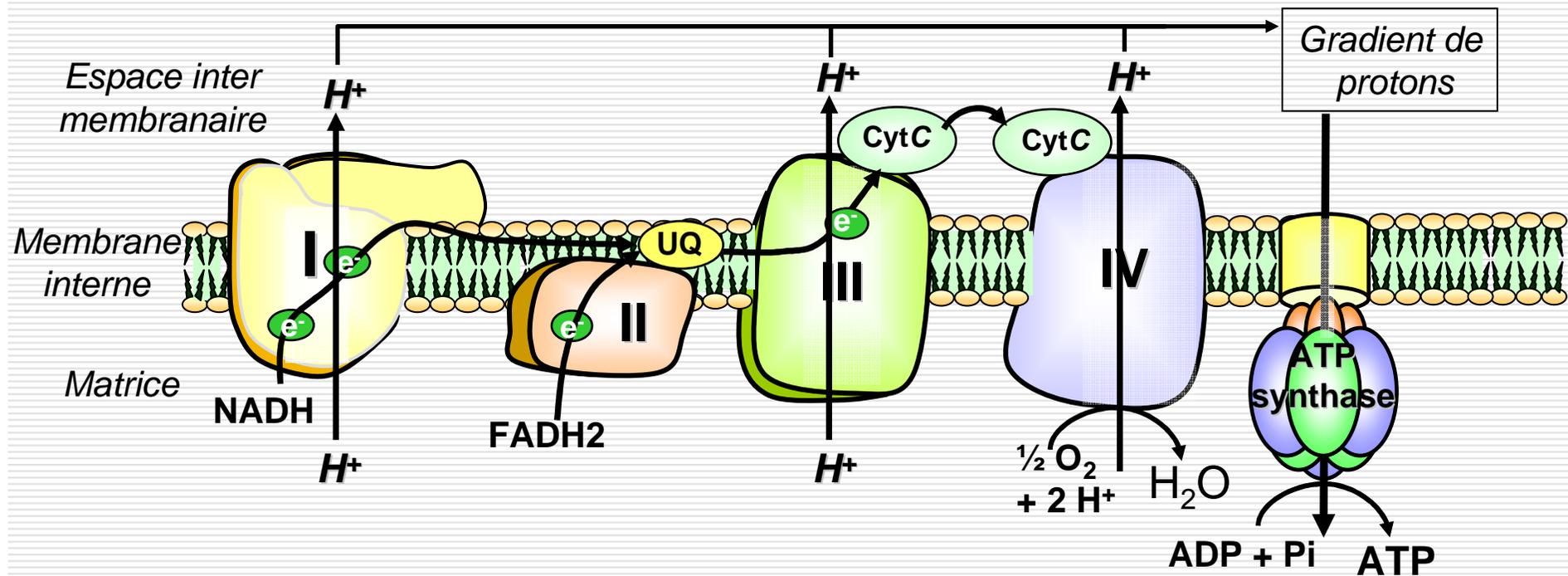
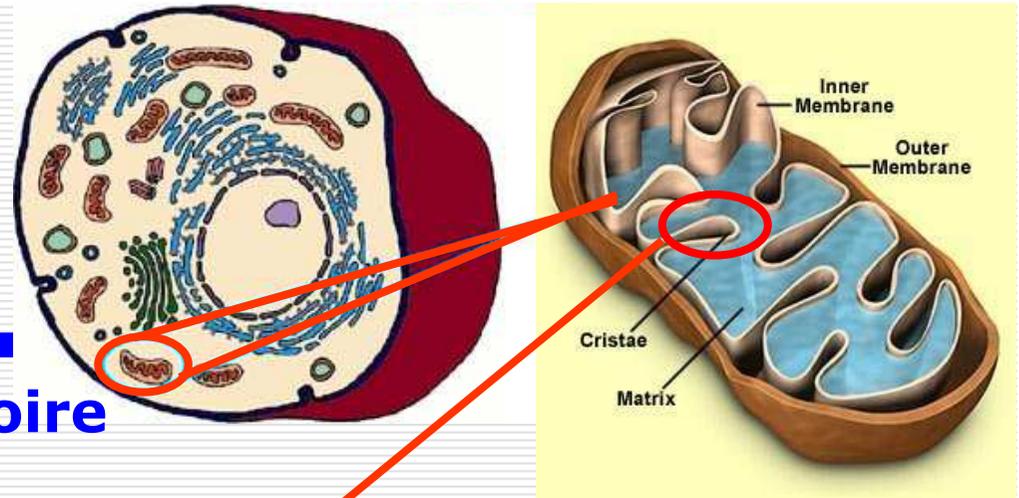
# Limites de la morphologie musculaire

---

- Absence d'anomalies:
    - chez l'enfant
    - déficit en Complexe I
  
  - Présence dans des maladies non primitivement mitochondriales (*myopathies inflammatoires*)
  
  - Anomalies: **stigmates de l'atteinte mitochondriale** mais n'orientent pas vers la cause de celle ci
-

# Cytopathies mitochondriales

## Déficit de la chaîne respiratoire



Oxydation nutriments

OXPHOS

ATP

# Exploration du fonctionnement de la chaîne des OXPHOS

---

□ Sur le **tissu atteint**: muscle, foie, cœur, rein ou fibroblastes en culture.

□ 2 méthodes:

Polarographie: mesure de la consommation d'oxygène en présence de différents substrats.

- intégrité de la double membrane
  - Tissu frais ou mitochondries isolées (>250 mg)
  - Vision globale du fonctionnement de la chaîne respiratoire
  - Peu sensible
-

# Spectrophotométrie

---

- activités enzymatiques des différents complexes
    - isolés (I, II, III, IV)
    - associés (I+III, II+III)
    - + citrate synthase = enzyme marqueur
  - Petit échantillon : 50 mg
  - Possible sur tissu congelé
  - Délai autorisé donc beaucoup plus facile à gérer
  - Plus sensible
-

# Chaîne des OXPHOS et limites

---

- Mise en évidence du dysfonctionnement
  - Déficit isolé
  - Déficit combiné complexes dépendant ADNmt

→ orientation génétique moléculaire

Mais

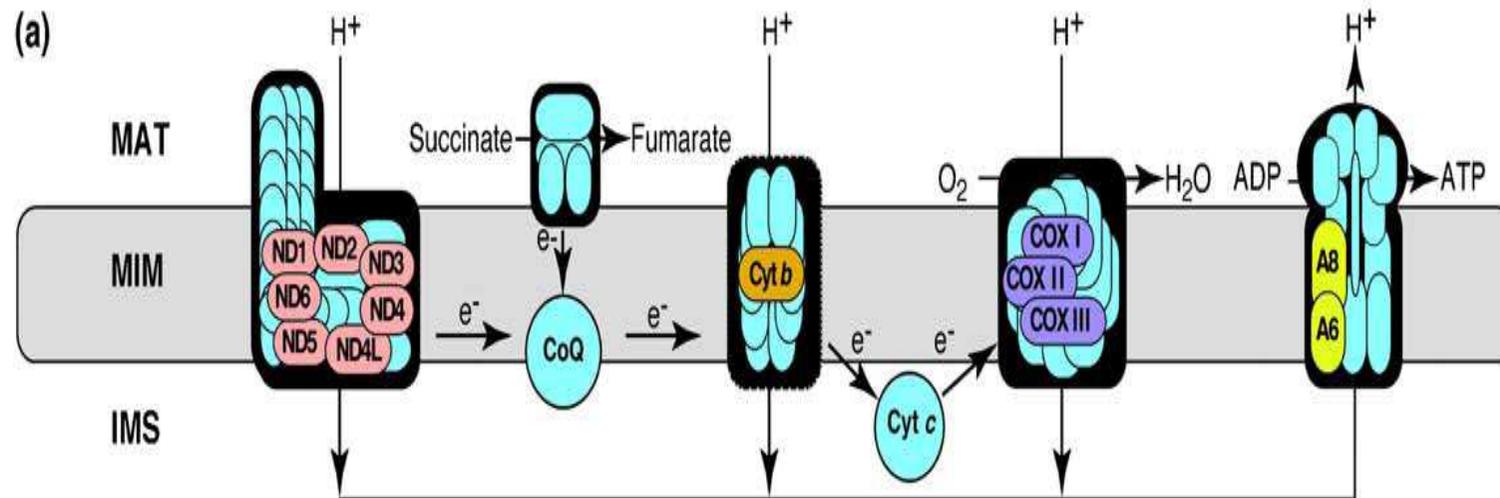
- Interprétation prudente
    - Déficits secondaires (traitement, autres atteintes métaboliques)
    - Non détection d'un déficit modéré
    - Dispersion des valeurs normales
    - Qualité de la conservation de l'échantillon
-

# Après les indices, les preuves..

---

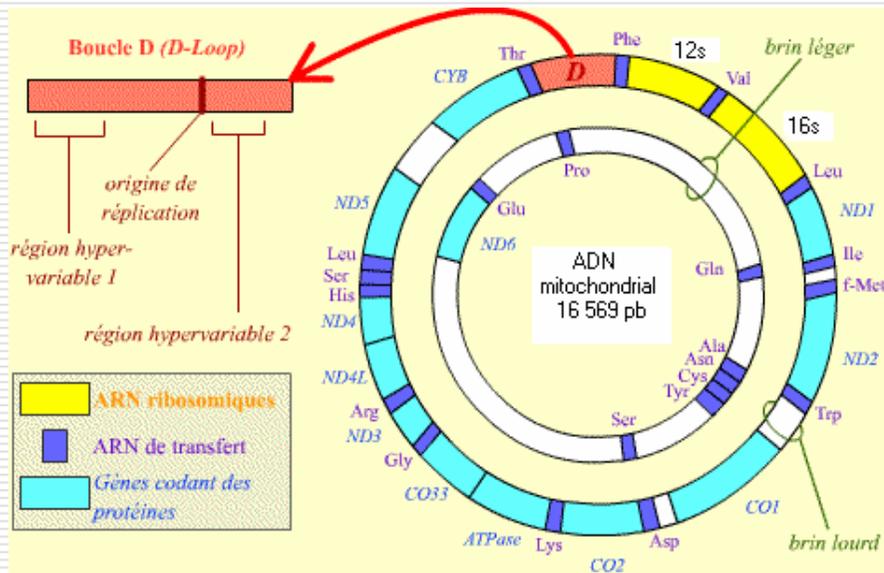
- le diagnostic définitif est porté seulement quand l'anomalie génétique est identifiée.
  
  - Diagnostic difficile
    - Où chercher? ADNmt ou gènes nucléaires?
    - double origine génétique des sous unités des complexes de la chaîne respiratoire
    - Nombreux gènes nucléaires impliqués, la plupart inconnus à ce jour
-

# Double origine génétique



Subunits	Complex I	Complex II	Complex III	Complex IV	Complex V
mtDNA-encoded:	7	0	1	3	2
nDNA-encoded:	~39	4	10	10	~14
"Assembly" factors:	~13	2	4	~20	2

# ADN Mitochondrial



- Circulaire double brin -16,5Kb
- Multiples copies
- Presqu'entièrement codant
- Entièrement dévolu à la chaîne des OXPHOS (37 gènes)
  - 13 gènes :ss U protéiques
  - 2 gènes ARNr
  - 22 gènes ARNt
- Pas d'intron
- Code génétique spécifique
- Hétéroplasmie: coexistence possible de copies d'ADN muté et sauvage
- Très polymorphe

# Gènes nucléaires

---

Gènes nécessaires à la biogénèse et à la fonction mitochondriale **estimés à ~1000**

- Sous unités protéiques chaîne OXPHOS (n=70)
  - Transcription
  - Traduction (n~ 100)
  - Import
  - Assemblage (centaines)
  - Synthèse ADNmt:
    - Synthèse dNTPs
    - Réplication
  - Dynamique mitochondriale
-

# Génétique moléculaire: quel(s) gène(s) étudier?

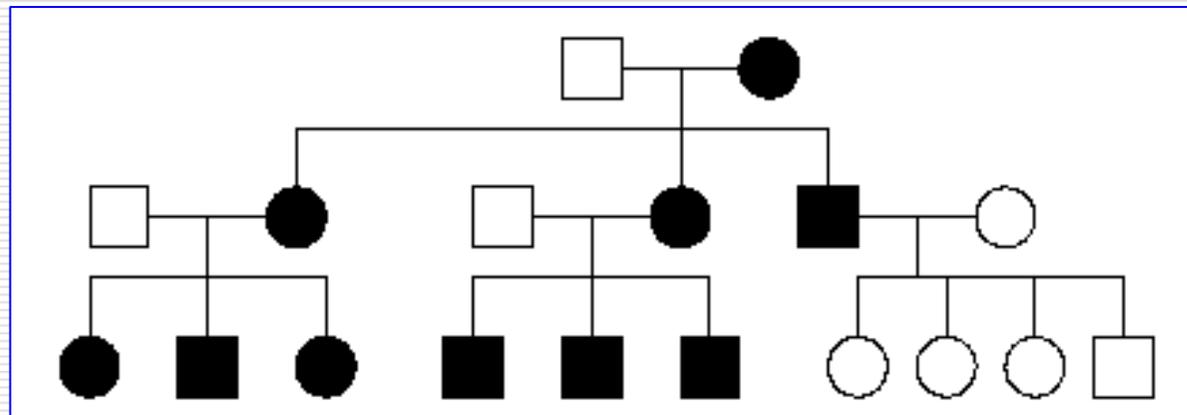
---

- **nécessité d'arbres décisionnels** fondés sur
    - l'âge,
    - le mode de transmission,
    - la clinique ,
    - la morphologie musculaire,
    - les activités de la chaîne des OXPHOS
  - **Interaction ++** avec le clinicien
-

## Orientation sur le mode de transmission

---

- Tous modes de transmission
- Peu de familles informatives
- Difficulté de distinguer transmission AR et sporadique , maternelle et AD.



Hérédité maternelle : ADNmt

---

# Orientation clinique

---

- Syndrome de **Leigh** :
    - ADNmt (MT-ATP6, MT-ND1,3,5 et 6)
    - gènes nucléaires (NDUFS1,3,4,7, SURF1,PDH)
  - Syndrome **MELAS**: ADNmt (MT-TL1,MT-ND5)
  - Syndrome **MERRF**: ADNmt (MT-TK)
  - Syndrome de **Pearson, Kearn Sayre, PEO**:  
ADNmt: délétion unique  
**PEO** ADNmt: délétions multiples=>gènes maintenance
  - Syndrome d'**Alpers**: ADNmt: déplétion=>gène nucléaire:  
POLG
  - **LHON**: ADNmt:3 mutations récurrentes (85% des atteints)
-

# Orientation en fonction du déficit de la chaîne des OXPHOS (1)

---

## Déficit isolé d'un complexe:

- ADNmt: gène(s) sous unité protéique correspondante (puis gène ARNt)
  
  - ADN nucléaire:
    - gène(s) sous unité protéique correspondante
    - gènes d'assemblage connus en fonction de la clinique
    - Exemple du CIV:
      - syndrome de Leigh :*SURF1*
      - Encéphalopathie+ défaillance hépatique: *SCO1*
      - Encéphalopathie+tubulopathie: *COX10*
      - CMH:*COX10, COX15*
      - cardio-encéphalomyopathie:*SCO2*.
-

# Orientation en fonction du déficit de la chaîne des OXPHOS (2)

---

## Déficit combiné des complexes dépendant de l'ADNmt

- ADNmt:
    - Anomalie de traduction des protéines mitochondriales : gène(s) d'ARNt (MT-TL1, MT-TK puis les 22)
    - Recherche d'une déplétion puis gènes nucléaires en fonction tissu atteint
    - Recherche de délétion(s) de l'ADNmt
  
  - ADN nucléaire:
    - Anomalie de traduction des protéines mitochondriales: tRNA synthases (DARS2, RARS2), facteurs élongation (EFTu, EFTs, EFG1...)
    - Gènes de maintenance si déplétion ou délétions
-

# Gènes nucléaires

---

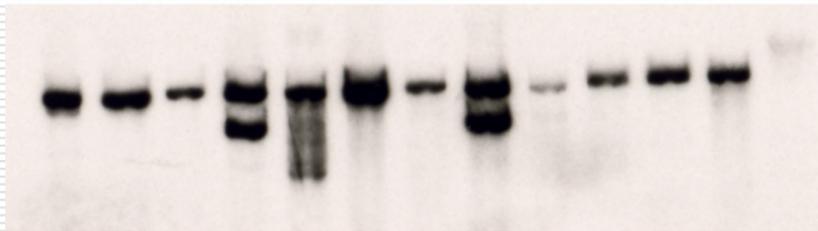
- ❑ On cherche ce que l'on connaît
- ❑ On ne trouve que ce que l'on cherche

Or , découverte permanente

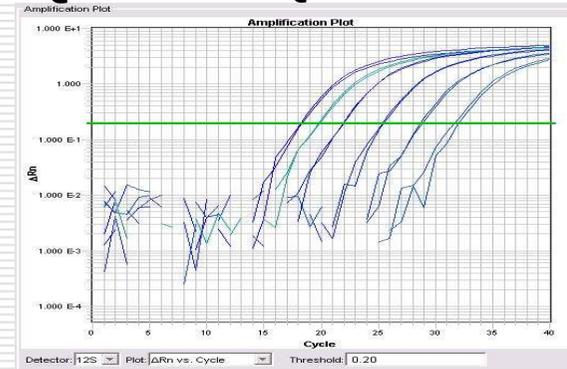
- ❑ de nouveaux gènes
  - ❑ de nouveaux phénotypes associés  
(*TK2, RRM2B*)
-

# Etude de l'ADNmt au laboratoire

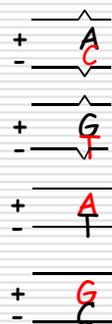
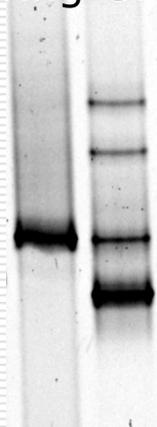
**Taille:** southern blot ou PCR longue



**Quantité:** Q-PCR



Recherche de **Mutations**  
Denaturing **G**radient **G**el **E**lectrophoresis

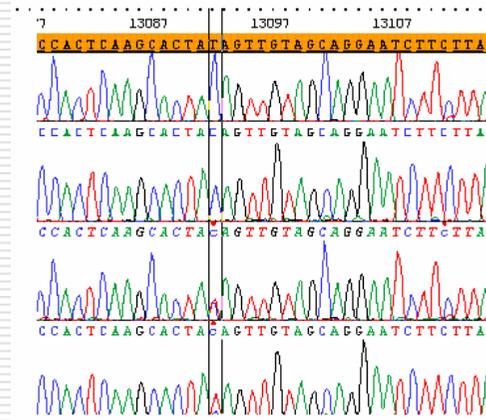


Hétéroduplex:

Normal

Muté

séquençage



*m.13091T>C*  
*MT-ND5*

muscle

sang

# Screening de tout l'ADNmt

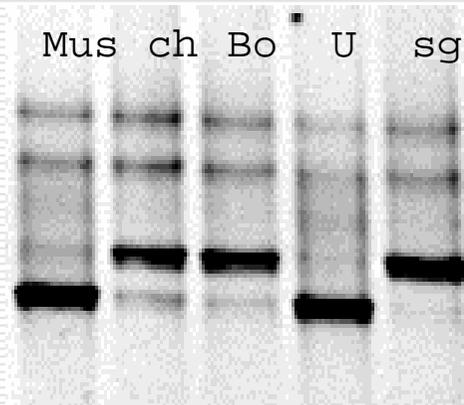
---

- Surveyor®** endonucléase seulement pour mutations hétéroplasmiques
- Mitochips®** puces de reséquençage Affymetrix® seulement pour mutations homoplasmiques
- Projet STIC-Véronique Paquis, Nice:750 patients, 10 centres diagnostiques français
- Séquençage sur tissu d'intérêt
- NGS?

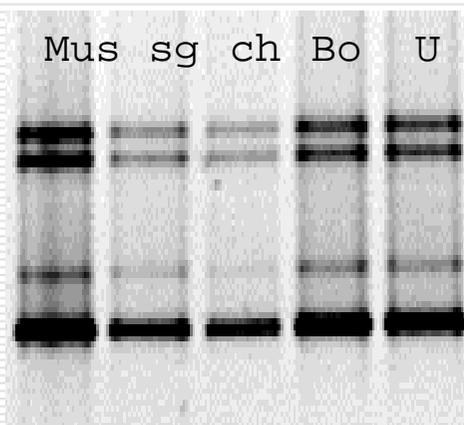


# ADNmt: étude sur tissu atteint car hétéroplasmie variable

## Denaturing Gradient Gel Electrophoresis

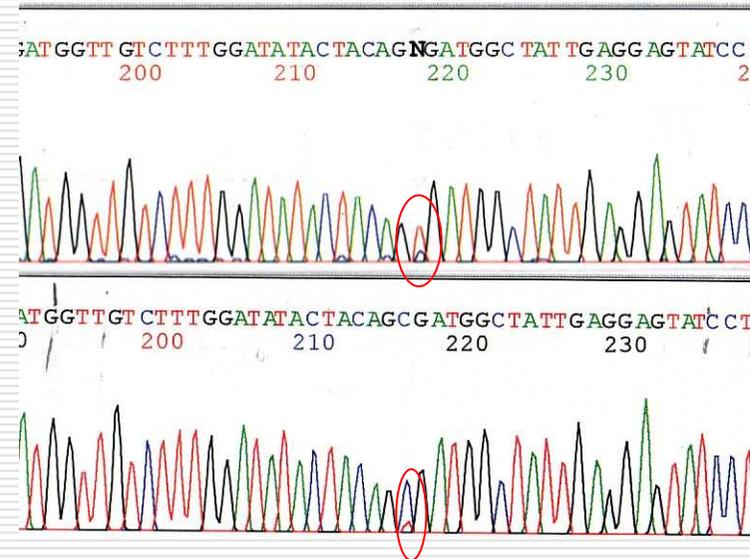


**m.3243A>G  
(MELAS)  
MT-TL1**



**m.8344A>G  
(MERRF)  
MT-TK**

## m.14459G>A p.A72V (MT-ND6)



Muscle

Sang

emme M.N, 63 ans, dystonie  
sévère puis NORB (AV < 1/10)  
fils décédé à 12 ans dystonie  
généralisée début à 5 ans

# Mutations pathogènes confirmées

## ADN mitochondrial

Régions codantes	Total=18	Phénotype clinique
<i>MT-ATP6</i>	3	Leigh Syndrome (LS)
<i>MT-COI</i>	1	SNHL
<i>MT-ND 1 à 6</i>	14	LHON (5), LS (7), MELAS (2)
Mutations tRNA et rRNA	Total=30	
<i>MT-RNR1</i>	2	SNHL
<i>MT-TL1</i>	<b>9</b>	MELAS, Myopathie, Diabète mitochondrial
<i>Mt-TK</i>	3	MERRF
<i>MT-TS1</i>	3	SNHL

[www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)

mutations rapportées: **132** (gènes codants) **103** (gènes ARNt et ARNr)

# Interprétation d'une variation de séquence de l'ADNmt

---

Polymorphisme ou mutation pathogène?

- [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org)
  - [www.genpat.uu.se/mtDB](http://www.genpat.uu.se/mtDB)
  - Nucléotide et AA conservé? Logiciel Alamut.
  - Hétéroplasmie
  - Répartition tissulaire
  - Études sur fibres uniques: relation déficit et % d'hétéroplasmie
  - Études fonctionnelles: cybrides
-

# Anomalies de taille de l'ADNmt

---

**Délétion** simple de grande taille de l'ADNmt:

- Syndromes de Pearson, Kearns Sayre,
- ophtalmoplégies externes progressives

**Évènement sporadique**

Transmission exceptionnelle



# Anomalies de taille de l'ADNmt

---

PCR longue ADN mt

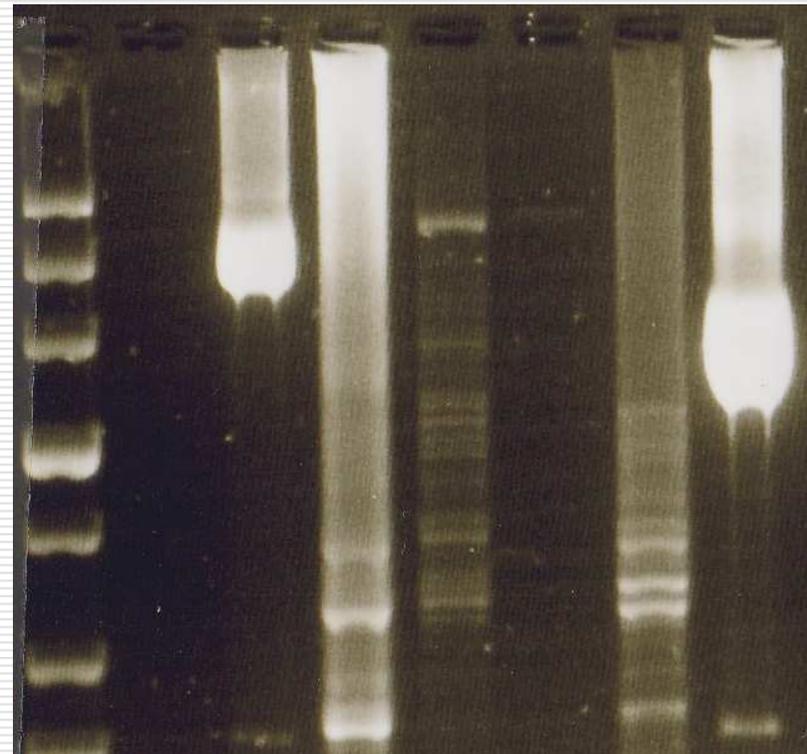
## Délétions multiples

orientant vers une mutation  
d'un gène nucléaire de  
maintenance de l'ADNmt:

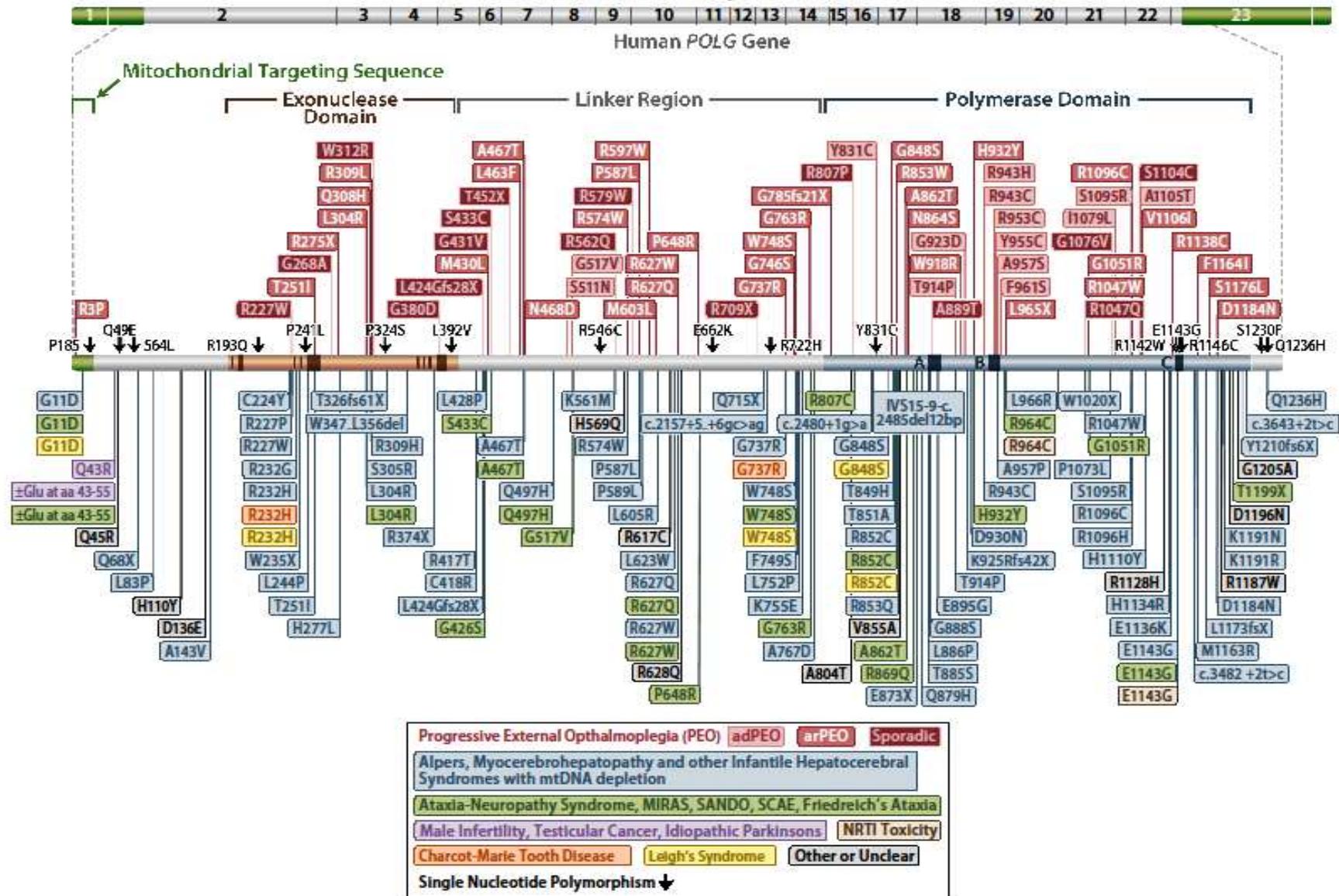
***POLG***, *PEO1*, *ANT1*, *ECGF1*  
(*TP*)...

spectre clinique très étendu  
(PEO, neuropathie, ataxie  
cerebelleuse, épilepsie,  
MNGIE)

**Transmission AR, AD**



## Mutations in DNA Polymerase $\gamma$ (POLG)

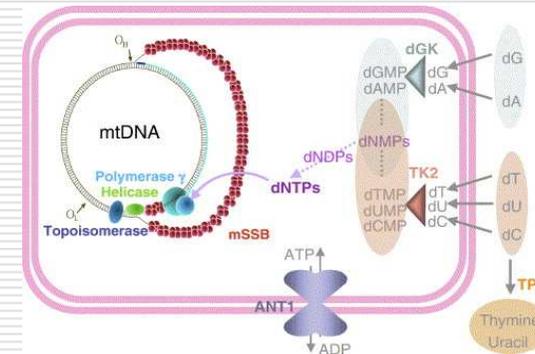
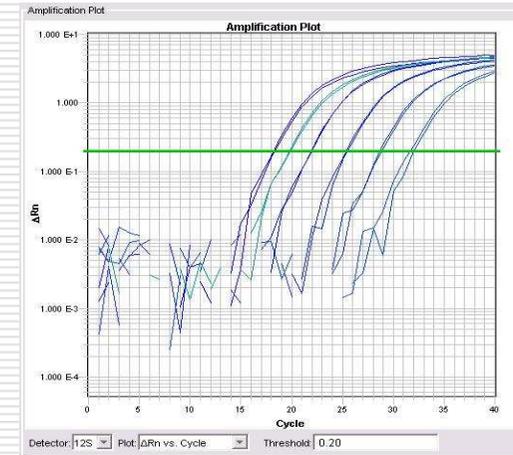


Base de Copeland

# Quantification de l'ADNmt

**déplétion** = diminution du nombre de copies d'ADNmt / enfant

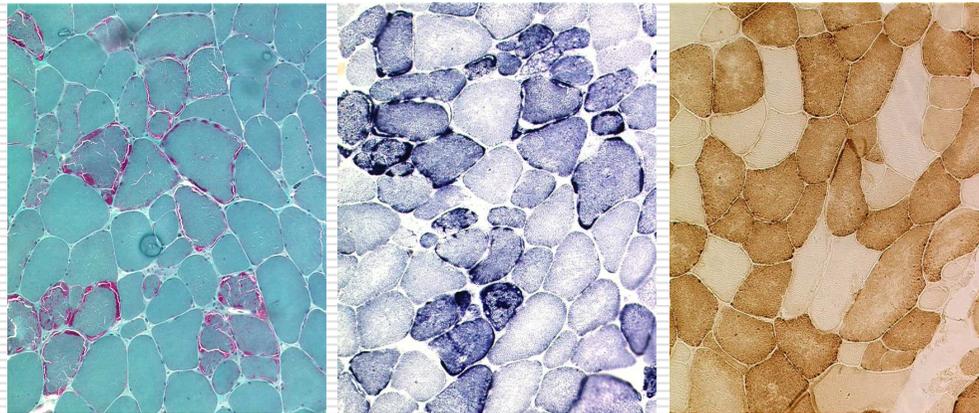
- foie: atteinte hépato cérébrale, hypoglycémie, hyperlactatémie:  
*DGUOK, POLG, MPV17, PEO1*
- muscle:
  - Myopathie: *TK2, RRM2B*
  - encéphalomyopathie *SUCLA2, SUCLG1*



# Quantification de l'ADNmt

---

**Augmentation** du nombre de copies d'ADNmt:  
prolifération réactionnelle →  
recherche en priorité d'une mutation ponctuelle  
ou d'une délétion de l'ADNmt



# Conclusion

---

- Maladies complexes de diagnostic souvent difficile
  - Faisceau d'arguments rarement tous réunis
  - Tableaux cliniques faussement « construits »
  - Nécessité de prise en charge dans des centres spécialisés
    - **Concertation pluridisciplinaire** : neurologie, radiologie, pédiatrie, anatomopathologie, biochimie, génétique
    - diagnostic différentiel
    - Arbres décisionnels et concertation inter-centres
-

# Conclusion

---

- **Maladies sous diagnostiquées:** intérêt des réseaux pour une offre diagnostique de qualité sur tout le territoire français
  - Diagnostic moléculaire définitif dans **20 à 30% cas**
  - **Suivi des patients**
  - **Conseil génétique:**
    - ADNmt:
      - Père atteint= impasse génétique
      - Mère atteinte= dépend de l'anomalie (mutation ponctuelle, délétion)
    - Gènes nucléaires: DPN possible et conseil en fonction du mode de transmission (AR, AD, liée à l'X)
  - Permet la naissance d'enfants non atteints.
-