

## Les premières souris « transmitochondriales »

Des mutations ou des délétions de l'ADN mitochondrial (ADNmt) ont été décrites depuis plus de dix ans dans des maladies mitochondriales et rendent compte de phénotypes extrêmement variables suivant les malades [1]. En effet, s'il est possible d'associer des syndromes à certaines délétions ou mutations, de nombreux cas particuliers de présentations cliniques font voler en éclat tout essai de corrélation génotype-phénotype. Ainsi, les délétions de grande taille de l'ADNmt se retrouvent le plus souvent dans des cas d'ophtalmoplégie externe ou dans le syndrome de Kearns-Sayre (bloc auriculoventriculaire, rétinite pigmentaire, ptosis de la paupière s'accompagnant ou non d'une myopathie). Toutefois, elles se rencontrent aussi dans une maladie hématologique et digestive de la petite enfance, le syndrome de Pearson [1]. De même, la mutation ponctuelle la plus courante de l'ADNmt (A3243G dans l'ARNt<sup>Leu</sup>) est associée de façon prépondérante au syndrome MELAS (*mitochondrial encephalomyopathy-lactic acidosis-stroke-like episodes*). On la retrouve néanmoins dans des familles atteintes de diabète et de surdité ([1] et *m/s* 1996, n°10 (suppl), p. 37). Pour expliquer ces différences d'expression phénotypique on invoque toujours l'hétéroplasmie (coexistence de molécules d'ADNmt normales et mutées au sein d'un même organe ou d'une même cellule) qui pourrait varier selon les tissus, les organes les plus touchés présentant un plus grand nombre de molécules mutées. Malheureusement, il est parfois difficile d'avoir accès aux organes exprimant le phénotype, ce qui empêche de vérifier cette hypothèse; et quand ceci est possible, il apparaît que l'hétéroplasmie variable ne rend pas nécessairement compte de l'implication différentielle des organes. Le besoin d'un modèle animal se faisait donc pres-

sant pour pouvoir étudier la complexité des relations génotype-phénotype des mutations de l'ADNmt, mais se heurtait à un problème de taille: comment introduire de façon stable de l'ADNmt muté dans des cellules de mammifères ?

Ceci vient d'être réalisé par un groupe japonais qui a produit des souris avec une délétion de l'ADNmt [2] et un groupe américain qui a créé une souris avec une mutation ponctuelle de l'ADNmt [3]. La première étape est commune aux deux études. Elle a consisté à introduire des mitochondries ayant soit une délétion de l'ADNmt, soit la mutation conférant une résistance au chloramphénicol (CAP<sup>R</sup>, inhibiteur du ribosome mitochondrial), dans des cellules sans ADNmt (*figure 1*). Ceci a été réalisé par la fusion de synaptosomes (vésicules cytoplasmiques de terminaisons nerveuses) de souris, avec délétion de l'ADNmt ou mutation CAP<sup>R</sup>, avec des cellules  $\rho^0$  (dépourvues d'ADNmt). Les « cybrides » obtenus ont ensuite été énucléés puis fusionnés soit à des pronucleus, dans le cas du modèle de souris avec délétion de l'ADNmt, soit avec des cellules ES, elles aussi  $\rho^0$ , dans le cas de la mutation CAP<sup>R</sup>. Les étapes suivantes décrites dans la *figure 1* permettent d'obtenir des souris chimériques, puis des femelles fondatrices (l'ADNmt est transmis par les mères) et enfin des souriceaux hétéroplasmiques pour la délétion ou pour la mutation de l'ADNmt.

Les souris obtenues constituent un excellent modèle de maladie mitochondriale humaine car elles présentent un phénotype proche de celui observé chez de nombreux malades. Tout d'abord, les souris CAP<sup>R</sup> chimériques présentent une cataracte congénitale, et une rétinite pigmentaire à deux semaines de vie qui ressemble aux anomalies rétinienues observées chez les malades. Ces souris CAP<sup>R</sup> chimériques transmettent la

mutation à leur descendance qui est soit homoplasmique (100 % d'ADNmt muté), soit hétéroplasmique (50 % d'ADNmt muté), tout au moins au niveau de la queue des souris. Les souriceaux CAP<sup>R</sup> présentent un retard de croissance majeur, une myopathie et une cardiomyopathie avec des anomalies histologiques semblables à celles observées chez les malades. Malheureusement, les souriceaux, qu'ils soient homoplasmiques ou hétéroplasmiques, meurent très rapidement (entre 12 heures et 11 jours), ce qui a empêché une étude poussée du phénotype au moins pour ces premières portées et n'a pas permis d'obtenir de descendance. Enfin, les taux d'hétéroplasmie dans les différents organes n'ont visiblement pas pu être estimés dans cette première étude.

Les souris avec une délétion de l'ADNmt présentent une hyperlactacidémie, une anémie et des anomalies histologiques du muscle strié mais sans les fameuses *ragged red fibers* (image caractéristique de myopathie mitochondriale avec accumulation de mitochondries à la périphérie de la fibre musculaire). Elles présentent également des anomalies histologiques au niveau du cœur. Elles meurent avant 200 jours de vie, d'insuffisance rénale par perte des fonctions tubulaires. A ce stade, le phénotype clinique de ces souris est décrit de façon extrêmement succincte, peut-être parce qu'il n'est pas celui que les auteurs espéraient. En effet, ce modèle peut paraître décevant car il ne donne pas le phénotype attendu de syndrome de Kearns-Sayre (myopathie et *ragged red fibers*) observé chez les adolescents et les adultes dans la majorité de cas de délétions de l'ADNmt. Cependant, il est en fait très proche de ce qu'on observe chez la plupart des jeunes enfants avec délétion de l'ADNmt qui ne présentent que peu d'anomalies histologiques du muscle. De plus, si l'ané-

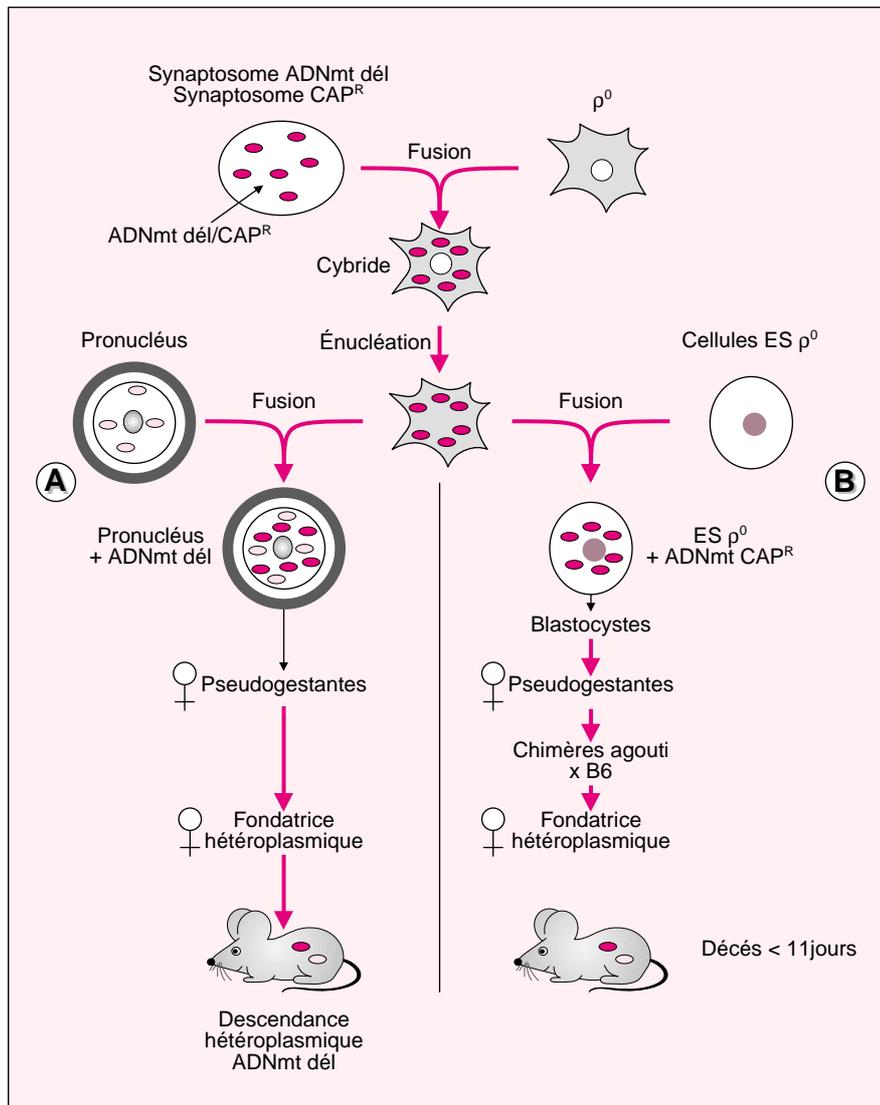


Figure 1. **Production de souris avec délétion (A) ou mutation hétéroplasmique de l'ADNmt (B).** La première étape est la fusion de cellules dépourvues d'ADNmt avec soit des synaptosomes ayant une délétion de l'ADNmt (ADNmt dél), soit des cytoplastes provenant d'une lignée cellulaire dont l'ADNmt est muté (CAP<sup>R</sup> : mutation de résistance au chloramphénicol). Les cybrides ainsi obtenus sont énucléés puis fusionnés : **A.** soit, dans le cas de l'ADNmt dél, avec des pronucléus qui sont ensuite implantés chez une femelle pseudogestante permettant ainsi l'obtention d'une fondatrice hétéroplasmique puis d'une descendance également hétéroplasmique ; **B.** soit, dans le cas de CAP<sup>R</sup>, avec des cellules ES sans ADNmt. Après culture et sélection le blastocyste est implanté chez une femelle pseudogestante, et l'on obtient alors des souris chimériques. Seule la première descendance a pu être étudiée car les souriceaux homoplasmiques et hétéroplasmiques meurent avant 11 jours de vie et, donc, aucune femelle hétéroplasmique fondatrice n'a été obtenue dans cette étude.

mie et l'insuffisance rénale ne sont pas les signes les plus fréquents chez les malades, ils restent cependant des signes d'appel de maladie mitochondriale [4]. Une analyse moléculaire très fine réalisée sur les organes de ces souris montre que les différents tissus présentent des taux relative-

ment homogènes d'hétéroplasmie, contrairement à ce qui est observé chez l'homme chez lequel il peut y avoir des variations entre 1% et 98% d'ADNmt muté d'un tissu à l'autre. La réalisation de ces deux modèles de souris « mitochondriales » constitue une prouesse technique car, jusqu'à maintenant, il avait toujours été impossible de créer et d'introduire de façon stable de l'ADNmt muté ou délété dans des cellules de mammifères. Ceci a été rendu possible par l'isolement de délétions somatiques de l'ADNmt chez des souris âgées d'une part, l'obtention d'une lignée cellulaire de souris CAP<sup>R</sup> d'autre part. Ces deux exemples, bien qu'ils n'aboutissent qu'à un petit nombre d'animaux, montrent une transmission à la lignée germinale des anomalies de l'ADNmt. Par ce système, il sera ainsi possible de introduire d'autres mutations de l'ADNmt chez des souris et d'étudier leurs conséquences tant au niveau moléculaire, biochimique que phénotypique. Ainsi, ces premiers modèles de maladie mitochondriale permettent maintenant d'envisager une étude fine des corrélations génotype-phénotype des mutations de l'ADNmt, et d'analyser la transmission de ces mutations et l'évolution de l'hétéroplasmie. Enfin, ces souris devraient également permettre de tester des molécules pour un futur traitement de ces maladies qui sont, au moins chez l'enfant, d'une très grande sévérité.

ment homogènes d'hétéroplasmie, contrairement à ce qui est observé chez l'homme chez lequel il peut y avoir des variations entre 1% et 98% d'ADNmt muté d'un tissu à l'autre. La réalisation de ces deux modèles de souris « mitochondriales » constitue une prouesse technique car, jusqu'à maintenant, il avait toujours été impossible de créer et d'introduire de façon stable de l'ADNmt muté ou délété dans des cellules de mammifères. Ceci a été rendu possible par l'isolement de délétions somatiques de l'ADNmt chez des souris âgées d'une part, l'obtention d'une lignée cellulaire de souris CAP<sup>R</sup> d'autre part. Ces deux exemples, bien qu'ils n'aboutissent qu'à un petit nombre d'animaux, montrent une transmission à la lignée germinale des anomalies de l'ADNmt. Par ce système, il sera ainsi possible de introduire d'autres mutations de l'ADNmt chez des souris et d'étudier leurs conséquences tant au niveau moléculaire, biochimique que phénotypique. Ainsi, ces premiers modèles de maladie mitochondriale permettent maintenant d'envisager une étude fine des corrélations génotype-phénotype des mutations de l'ADNmt, et d'analyser la transmission de ces mutations et l'évolution de l'hétéroplasmie. Enfin, ces souris devraient également permettre de tester des molécules pour un futur traitement de ces maladies qui sont, au moins chez l'enfant, d'une très grande sévérité.

1. MITOMAP Human mitochondrial genome database. Center for molecular medicine, Emory University, Atlanta, Ga USA. (<http://www.gen.emory.edu/mitomap.html>)
2. Inoue K, Nakada K, Ogura A, et al. Generation of mice with mitochondrial dysfunction by introducing mouse mtDNA carrying a deletion into zygotes. *Nat Genet* 2000; 26: 176-81.
3. Sligh JE, Levy SE, Waymire KG, et al. Maternal germ-line transmission of mutant mtDNAs from embryonic stem cell-derived chimeric mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 14461-6.
4. Rötig A, Lehnert A, Chrétien D, et al. Atteinte rénale au cours des cytopathies mitochondriales. *Med Sci* 1997; 13: 18-27.

**Agnès Rötig**

*Inserm U. 393, Hôpital Necker-Enfants Malades, 149, rue de Sèvres, 75015 Paris, France.*